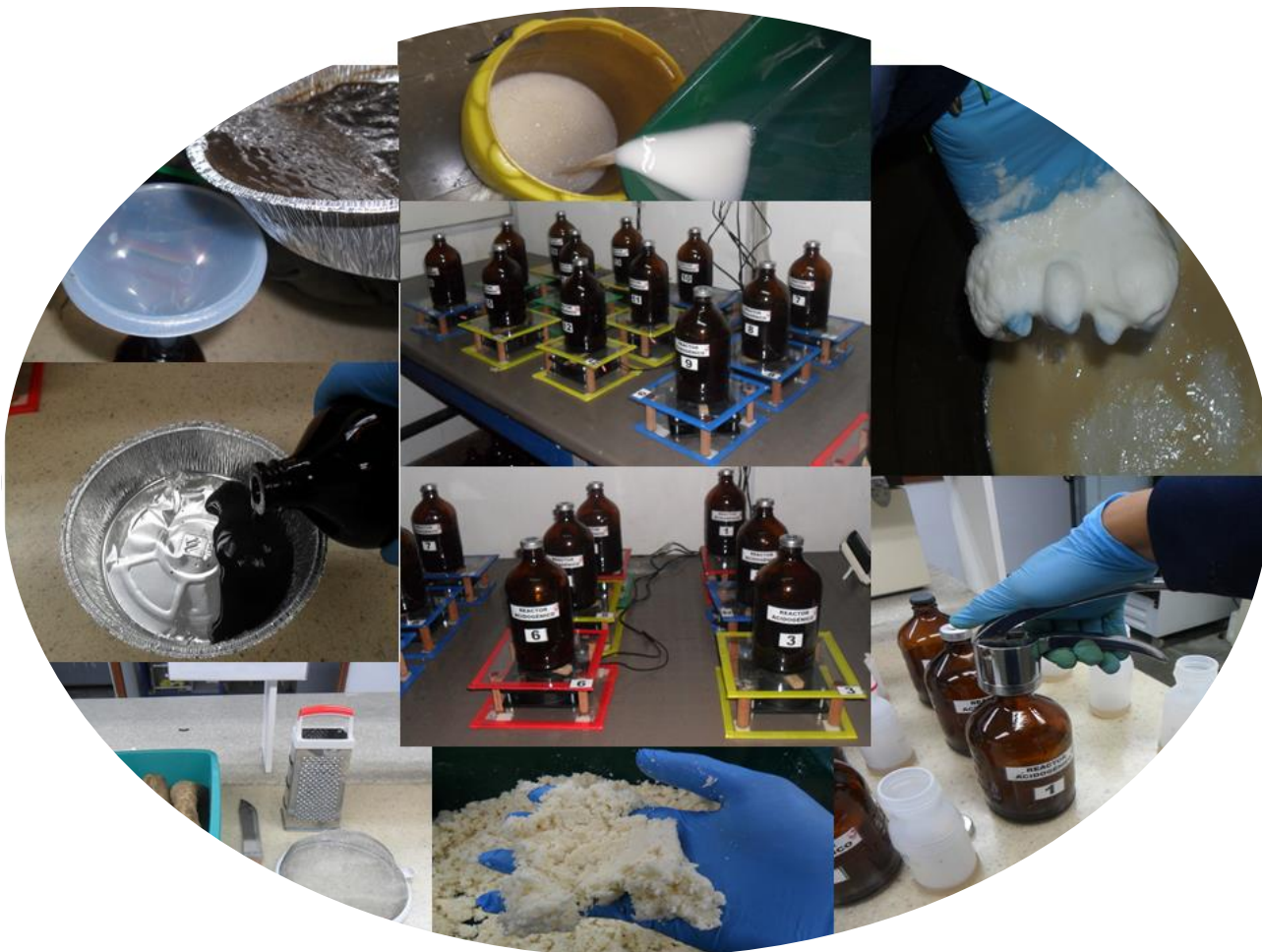


INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO A PARTIR DE AGUA RESIDUAL AGROINDUSTRIAL



**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA DE RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE
PROGRAMA ACADÉMICO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL
SANTIAGO DE CALI
2015**

**INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO A PARTIR
DE AGUA RESIDUAL AGROINDUSTRIAL**

JULIÁN DAVID BARRIOS PÉREZ

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO SANITARIO Y AMBIENTAL**

DIRECTORA


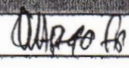

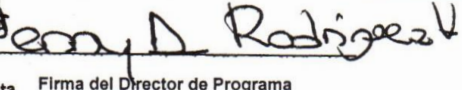
Ing. JENNY ALEXANDRA RODRÍGUEZ VICTORIA, Dra

CODIRECTORA

Ing. TATIANA MAÑUNGA, M.Eng

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA DE RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE
PROGRAMA ACADÉMICO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL
SANTIAGO DE CALI
2015**

ACTA DE APROBACIÓN

|  | FACULTAD DE INGENIERIA Coordinación Académica Programa Académico de INGENIERIA SANITARIA Y AMBIENTAL | ACTA DE SUSTENTACIÓN | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-------------|-------|-----|-----|---|-----|-----|---|-----|------|---|
| INFORMACIÓN GENERAL | | | | | | | | | | | | | | |
| Título del trabajo Influencia del pH Sobre la Producción Biológica de Hidrógeno a Partir de Agua Residual Agroindustrial. | | FECHA DÍA: 9 MES: 6 AÑO: 2015 HORA: 10:00 a.m. | | | | | | | | | | | | |
| Estudiante(s) JULIAN DAVID BARRIOS PEREZ | | Código 200839717 | | | | | | | | | | | | |
| Nombre del director 1 PROFESORA JENNY A. RODRIGUEZ VICTORIA | | | | | | | | | | | | | | |
| N/A Nombre del director 2 INGENIERA TATIANA MAÑUNGA | | Firma | | | | | | | | | | | | |
| N/A Nombre del Asesor 1 | | Firma | | | | | | | | | | | | |
| N/A Nombre del Asesor 2 | | Firma | | | | | | | | | | | | |
| COMITÉ EVALUADOR | | | | | | | | | | | | | | |
| Nombre del evaluador INGENIERO MAURICIO RODRIGUEZ | | Firma  | | | | | | | | | | | | |
| PROFESORA TATIANA RODRIGUEZ | | Firma | | | | | | | | | | | | |
| EVALUACIÓN | | | | | | | | | | | | | | |
| Escala de evaluación | | | | | | | | | | | | | | |
| Excelente 5.0 - 4.8 | Muy bueno 4.7 - 4.5 | Bueno 4.4 - 4.0 | | | | | | | | | | | | |
| Regular 3.9 - 3.5 | Aceptable 3.4 - 3.0 | Deficiente 2.9 - 1 | | | | | | | | | | | | |
| Nota definitiva documento final (a diligenciar por el director del programa académico) Sustentación (a diligenciar por el jurado evaluador) NOTA FINAL | | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Nota</th> <th>Ponderación</th> <th>Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">4.6</td> <td style="text-align: center;">40%</td> <td style="text-align: center;">0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4.6</td> <td style="text-align: center;">60%</td> <td style="text-align: center;">0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4.6</td> <td style="text-align: center;">100%</td> <td style="text-align: center;">0</td> </tr> </tbody> </table> | Nota | Ponderación | Total | 4.6 | 40% | 0 | 4.6 | 60% | 0 | 4.6 | 100% | 0 |
| Nota | Ponderación | Total | | | | | | | | | | | | |
| 4.6 | 40% | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 4.6 | 60% | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 4.6 | 100% | 0 | | | | | | | | | | | | |
| OBSERVACIONES | | | | | | | | | | | | | | |
| Nota final 4,6. | | | | | | | | | | | | | | |
| DEFINICIÓN Y COMPROMISOS MENCIÓN | | | | | | | | | | | | | | |
| Como evaluadores y de común acuerdo consideramos que, una vez realizada la sustentación, el trabajo merece mención y nos comprometemos a completar el trámite correspondiente para solicitarla. | | | | | | | | | | | | | | |
| SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> MERITORIA <input type="checkbox"/> LAUREADA <input type="checkbox"/> | | | | | | | | | | | | | | |
| La decisión anterior queda sujeta a la revisión del cumplimiento de todos los requisitos establecidos en la Resolución xxx de Enero de 2015 | | | | | | | | | | | | | | |
|  UNIVERSIDAD DEL VALLE FACULTAD DE INGENIERIA E I D E N A R Programa Académico de Ingeniería Sanitaria y Ambiental DIRECTOR | | Firma del Director de Programa  | | | | | | | | | | | | |

DEDICATORIA

A Dios por haberme ayudado a afrontar con fortaleza y sabiduría esta etapa de mi vida

A mi madre por ser ejemplo de superación, por demostrarme que para ser exitoso solo se necesita de amor y pasión

A mi padre, por siempre haber estado presente durante mi formación personal y profesional, y por enseñarme a ser respetuoso, honesto y responsable

A mis hermanos Michael y Camilo por ser ejemplos a seguir

A mi tía pilar y primos (Lina, Gerardo y Yasir) por su apoyo incondicional

A mi gran amor Paola Andrea por apoyarme siempre y por haber estado ahí cuando más lo necesite

A Todos mil gracias.

Con amor Julián David

AGRADECIMIENTOS

A la Profesora **Jenny Rodríguez V.**, directora de la tesis por sus enseñanzas y orientación durante el desarrollo de la investigación y redacción del documento

A la Profesora **Tatiana Mañunga.**, Co-directora de la tesis por su apoyo y orientación durante el desarrollo de la investigación y redacción del documento

A la profesora **Tatiana Rodríguez C.**, por la colaboración brindada durante la caracterización de las muestras de Biogás

Al profesor **Jaime Mosquera**, por la colaboración brindada en el manejo de datos y análisis estadístico

Al señor **Jorge I, Silva** propietario de la rallandería, por su amabilidad y valiosa colaboración durante el estudio

A la **Universidad del Valle** y **COLCIENCIAS** por facilitar los espacios y la financiación necesaria para el desarrollo de la investigación

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN | 10 |
| INTRODUCCIÓN | 11 |
| 1. OBJETIVO GENERAL | 12 |
| 1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 12 |
| 2. MARCO REFERENCIAL | 13 |
| 2.1. PRODUCCIÓN DE HIDROGENO (H ₂) | 13 |
| 2.2. DIGESTIÓN ANAEROBIA | 14 |
| 2.3. SINTROFIA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA | 15 |
| 2.4. TERMODINÁMICA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA | 16 |
| 2.5. PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A TRAVÉS DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA | 17 |
| 2.5.1. Presión parcial de hidrógeno | 17 |
| 2.5.2. Pre-tratamiento del inóculo | 19 |
| 2.5.3. Microbiología de la producción de H ₂ | 21 |
| 2.6. EFECTO DEL pH EN LA PRODUCCIÓN DE H ₂ | 24 |
| 2.7. EFECTO DE LA CAPACIDAD BUFFER EN LA PRODUCCIÓN DE H ₂ | 25 |
| 2.8. SUSTRATO | 28 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 31 |
| 3.1. AGUA RESIDUAL | 32 |
| 3.2. INOCULO | 34 |
| 3.2.1. Selección | 34 |
| 3.2.2. Aclimatación | 34 |
| 3.2.3. Pre-tratamiento | 35 |
| 3.3. MONTAJE EXPERIMENTAL | 36 |
| 3.4. EVALUACIÓN | 36 |
| 3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS | 38 |
| 3.6. MANEJO DE DATOS | 40 |
| 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 41 |
| 4. ANÁLISIS Y RESULTADOS | 42 |
| 4.1. SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA PRESIÓN TOTAL EN REACTORES ACIDOGÉNICOS | 42 |
| 4.1.1. Efecto de la temperatura ambiente sobre la presión total en reactores acidogénicos (RA) | 43 |
| 4.1.2. Efecto de las tasas de producción de biogás sobre la presión total en RA | 45 |
| 4.2. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO TÉRMICO Y DEL pH INICIAL | 49 |
| 4.2.1. Análisis estadístico | 49 |
| 4.3. EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE BIOGÁS EN REACTORES ACIDOGÉNICOS ... | 53 |

| | | |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.4. | EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE H ₂ EN REACTORES ACIDOGÉNICOS (RA) | 56 |
| 4.5. | EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES FISICOQUÍMICAS | 58 |
| 4.5.1. | Carbohidratos..... | 59 |
| 4.5.2. | pH, Alcalinidad Bicarbonática y AGVs | 59 |
| 5. | CONCLUSIONES | 63 |
| 6. | RECOMENDACIONES..... | 64 |
| | BIBLIOGRAFIA | 65 |
| | ANEXOS | 76 |

LISTADO DE TABLAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 2.1. Alternativas biológicas utilizadas en la producción de H_2 | 13 |
| Tabla 2.2. Valores de energía libre en reacciones catabólicas de la digestión anaerobia | 16 |
| Tabla 2.3. Aplicaciones prácticas para disminuir el efecto de la presión parcial de H_2 | 18 |
| Tabla 2.4. Condiciones de pre-tratamiento térmico y químico (ácido-básico) | 20 |
| Tabla 2.5. Experiencias relacionadas con la evaluación del efecto del pH inicial en la producción de H_2 | 25 |
| Tabla 2.6. Experiencias relacionadas con el uso de buffer en la producción de H_2 | 28 |
| | |
| Tabla 3.1. Caracterización fisicoquímica del agua residual agroindustrial | 32 |
| Tabla 3.2. Caracterización fisicoquímica del inóculo aclimatado | 34 |
| Tabla 3.3. Definición del periodo de aclimatación y mezcla | 35 |
| Tabla 3.4. Caracterización fisicoquímica del inóculo pre-tratado | 35 |
| Tabla 3.5. Caracterización fisicoquímica del inóculo pre-tratado | 35 |
| Tabla 3.6. Métodos empleados para caracterizar el agua residual agroindustrial y sobrenadante | 39 |
| Tabla 3.7. Métodos para caracterizar el inóculo aclimatado y pre-tratado | 39 |
| Tabla 3.8. Configuración del cromatógrafo de gases | 39 |
| | |
| Tabla 4.1. Parámetros cinéticos de las curvas de producción acumulada de Biogás | 47 |
| Tabla 4.2. Presiones de Biogás en reactores acidogénicos | 49 |
| Tabla 4.3. Cuadro de análisis de varianza para un diseño 2X3 factorial..... | 51 |
| Tabla 4.4. POST ANOVA para el factor pH inicial..... | 52 |
| Tabla 4.5. Composición del biogás en RA evaluados según el tipo de pre-tratamiento y pH inicial | 53 |
| Tabla 4.6. Producción de H_2 en Reactores Acidogénicos | 56 |
| Tabla 4.7. Caracterización fisicoquímica del sobrenadante en Reactores Acidogénicos..... | 58 |

LISTADO DE FIGURAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 2.1. Secuencia metabólica y grupos microbianos que intervienen en la digestión anaerobia | 14 |
| Figura 2.2. Mecanismo de la degradación sintrófica del butirato | 15 |
| Figura 2.3. Efecto del pre-tratamiento térmico y químico de un inoculo en la producción de H ₂ :(a) Inoculo, (b) Inoculo pre-tratado, (c) Inoculo sin pre-tratamiento, (d) Inoculo pre-tratado a pH 5.0 a 6.0 unidades, (e) Inoculo pre-tratado a pH 7.0 a 8.0 unidades, y (f) Inoculo sin pre-tratamiento..... | 21 |
| Figura 2.4. Representación gráfica de la transición de una espora a célula activa..... | 21 |
| Figura 2.5. Ruta bioquímica en bacterias entéricas para la producción de H ₂ | 23 |
| Figura 2.6. Ruta bioquímica en bacterias anaerobias estrictas (<i>Clostridium</i>) para la producción de H ₂ ... | 23 |
| Figura 2.7. Diagrama del proceso de extracción de almidón de yuca | 29 |
| | |
| Figura 3.1. Etapa de Lavado y pelado de la yuca..... | 32 |
| Figura 3.2. Rallado de la yuca y homogenización | 33 |
| Figura 3.3. Tamizado o colado de la yuca | 33 |
| Figura 3.4. Sedimentación | 33 |
| Figura 3.5. Montaje experimental y detalles de sus elementos | 36 |
| Figura 3.6. Medidor de presión (manómetro)..... | 38 |
| Figura 3.7. Curva teórica de presiones totales..... | 38 |
| Figura 3.8. Combinaciones de tratamientos en un diseño 2x3 factorial | 41 |
| | |
| Figura 4.1. Curva teórica de presiones totales..... | 42 |
| Figura 4.2. Curvas de presión total en reactores con pre-tratamiento químico y pH inicial | 42 |
| Figura 4.3. Curvas de presión total en reactores con pre-tratamiento térmico y pH inicial | 43 |
| Figura 4.4. Comportamiento de la Temperatura Ambiente | 43 |
| Figura 4.5. Curva teórica de la producción acumulada de Biogás | 46 |
| Figura 4.6. Curva de producción acumulada de biogás en RA con pre-tratamiento químico y pH inicial .. | 46 |
| Figura 4.7. Curva de producción acumulada de biogás en RA con pre-tratamiento térmico y pH inicial... | 46 |
| Figura 4.8. Valores Individuales de las Presiones Máximas de Biogás | 50 |
| Figura 4.9. Interacción de los valores medios de las Presiones Máximas de Biogás | 51 |
| Figura 4.10. Prueba de normalidad de residuos de Presiones Máximas de Biogás | 52 |
| Figura 4.11. Concentración de H ₂ y CH ₄ en RA evaluados mediante Pre-tratamiento Químico y pH inicial | 55 |
| Figura 4.12. Concentración de H ₂ y CH ₄ en RA evaluados mediante Pre-tratamiento Térmico y pH inicial | 55 |
| Figura 4.13. Reducción de carbohidratos (%) en Reactores Acidogénicos | 59 |
| Figura 4.14. pHs iniciales y finales en Reactores Acidogénicos | 60 |
| Figura 4.15. Alcalinidad Bicarbonatica en Reactores Acidogénicos | 61 |
| Figura 4.16. Ácidos Grasos Volátiles Finales en Reactores Acidogénicos | 62 |

RESUMEN

El agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca se caracteriza principalmente por ser un residuo orgánico con un potencial de tratamiento biológico grande debido a la presencia de materia orgánica en forma soluble (carbohidratos principalmente). Gracias a esta característica se promueve su aprovechamiento y valorización, ya que por medio de un proceso biológico como la fermentación oscura se genera un vector energético como el hidrógeno (H_2) que además de ser amigable con el medio ambiente amplía la oferta energética de los biocombustibles (bioetanol, biodiesel y metano).

En este trabajo de investigación se evaluó la influencia del pH inicial sobre la producción de hidrógeno de un inóculo pre-tratado y alimentado con agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. El pH inicial se evaluó en tres niveles (5.7, 5.4, y 5.0 unidades) y el tipo de pre-tratamiento en dos (químico y térmico).

Para garantizar cada nivel de pH inicial, se acondicionó el agua residual del proceso de extracción de almidón con bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$). El pre-tratamiento térmico del inóculo se realizó a $85^{\circ}C$ durante 30 minutos; mientras que en el pre-tratamiento químico, el inóculo fue expuesto a un pH ácido (3.0 unidades) durante 24 horas. Después del acondicionamiento del agua residual y del inóculo, se iniciaron los ensayos experimentales, los cuales se realizaron a temperatura ambiente ($29.0 - 34.5^{\circ}C$) durante aproximadamente 15 días. En este tiempo, la producción de H_2 se monitoreó indirectamente mediante la construcción de curvas de presión de biogás, las cuales proporcionaron información para la toma de muestra del biogás. Posteriormente se cuantificó la cantidad de H_2 producido por cromatografía gaseosa.

Los resultados mostraron que el proceso se vio afectado principalmente por el pH inicial y en menor medida por el tipo de pre-tratamiento. En este sentido los valores de pH inicial que influyeron significativamente sobre la producción de H_2 fueron 5.0 y 5.4 unidades. Específicamente la condición experimental que reflejó una mayor producción de H_2 ($1,245 \text{ mol. mol Glucosa}^{-1}$) fue el pre-tratamiento térmico del inóculo a pH inicial de 5.0 unidades. Mientras que con el pre-tratamiento químico a 5.4 unidades se obtuvo una producción de $1,100 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol Glucosa}^{-1}$.

En el análisis exploratorio de las presiones máximas de biogás a través de la estadística se logró corroborar que el pH inicial fue el único que mostró tener un efecto significativo ($0,006 < 0,05$) sobre el comportamiento de las presiones máximas de Biogás, y debido a que las medias de las presiones a pH inicial de 5.0 y 5.4 unidades no fueron significativamente diferentes, como sí sucedió con el pH inicial de 5.7 unidades. Se determinó que la condición óptima en términos tanto de las presiones como del rendimiento, se hallaba en el rango de pH inicial de 5.0 a 5.4 unidades. Descartando por completo el pH inicial de 5.7 unidades, por ser la condición menos favorable para llevar a cabo la producción de H_2 y Biogás.

Palabras clave: Fermentación oscura, Agua residual agroindustrial, Bio-hidrógeno, pH inicial, Pre-tratamiento de Inóculo

INTRODUCCIÓN

El hidrógeno (H_2) es reconocido actualmente como una fuente de energía alternativa que no genera efectos adversos para el medio ambiente (Loss, 2011), ya que su combustión solo genera agua y por lo tanto no se producen contaminantes atmosféricos (Castro, 2012). Se caracteriza principalmente por tener un alto potencial energético (122kJ/g); el cual puede ser 2.4, 2.8 y 4 veces mayor que el obtenido con metano, gasolina y carbón, respectivamente. Y también porque se necesita en la producción de petróleo, alimentos, metales y fertilizantes (Lipman, 2011).

Aunque H_2 es el elemento más común en la Tierra, este no se produce de forma elemental sino a través de procesos termoquímicos. Actualmente su producción mundial se estima en 1.000 millones de $m^3 \cdot dia^{-1}$ de los cuales el 48% se produce a partir de gas natural, 30% de aceite pesados, 18% a partir del carbón, y el restante (4%) por electrólisis del agua (Jong, 2009).

En virtud de la demanda de estos recursos (no renovables) por parte del sector energético, se ha centrado a nivel mundial la atención sobre la producción de H_2 a partir de recursos renovables (biomasa) y procesos biológicos. Lo cual resulta ser una opción sumamente atractiva y benéfica con respecto a los siguientes temas i) Contaminación ambiental, ii) Cambio climático, iii) Accesibilidad a fuentes de energía renovable, y iv) Estabilidad y Seguridad en los precios de energía (Balachandar et al., 2013).

La fermentación oscura o primera etapa de la digestión anaerobia en fases separadas ha demostrado ser una tecnología prometedora para la producción biológica de hidrógeno, no solo por su rendimiento y tasa de producción de H_2 (Hallenbeck y Ghosh, 2009). Sino también porque los requerimientos de energía son bajos y acepta una gran variedad de residuos como sustratos para la producción de H_2 (Wang y Wan, 2009a). Por esta razón, las investigaciones realizadas en los últimos años en este campo muestran que puede ser entendido como un proceso de valorización energética a partir de los subproductos generados en etapas intermedias (acidogénesis y metanogénesis) de la digestión anaerobia (Li y Fang, 2007).

En este sentido la producción de H_2 a través de la digestión anaerobia se logra mediante el control de variables ambientales u operacionales tales como: i) temperatura, ii) pH, iii) concentración de sustrato, iv) tipo de reactor, v) alcalinidad, vi) nutrientes, vii) método de inoculación, y viii) tipo de inóculo y pre-tratamiento (Ginkel y Logan, 2005; Temudo et al., 2007; Clark et al., 2012; Mohammadi et al., 2012b; Muñoz et al., 2014).

Particularmente el pH es una de las variables operacionales que más puede influir sobre la producción de H_2 debido a que el metabolismo de los microorganismos es altamente dependiente del pH interno y externo, y no soportan condiciones extremas de esta variable (Temudo et al., 2007; Hallenbeck, 2013).

El pH según Horiuchi et al. (2002); Angenent et al. (2004b); y Dávila y Razo (2007) también es importante para entender los efectos de la producción ácidos orgánicos sobre la producción de H_2 , ya que existen tanto rutas bioquímicas que favorecen la producción de H_2 tales como fermentación butírica y fermentación acética, como rutas bioquímicas que no favorecen la producción de H_2 tales como fermentación láctica y producción de alcoholes.

Teniendo en cuenta lo anterior, en esta tesis de investigación se evaluó el efecto del pH en la producción de H_2 a partir de un inóculo pre-tratado y alimentado con un agua residual agroindustrial (sustrato) procedente del proceso de extracción de almidón de yuca. Básicamente este trabajo de investigación se realizó también para avanzar a nivel local en uno de los aspectos (desarrollo tecnológico) mencionados por Riechmann (2009) para trascender de la actual economía del carbono hacia una economía basada en fuentes de energía renovable.

1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia del pH sobre la producción de hidrógeno a partir de un inóculo pre-tratado y alimentado con agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca

1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de dos metodologías de pre-tratamiento de un inóculo sobre la producción de hidrógeno a partir del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca
- Evaluar el efecto de tres valores de pH sobre la producción de hidrógeno a partir del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. PRODUCCIÓN DE HIDROGENO (H₂)

Según Das y Veziroğlu (2001) y Hallenbeck y Ghosh (2009) el hidrógeno (H₂) tiene un poder calorífico de 3042 cal.m⁻³, y durante su combustión el agua es el producto principal. Por tanto, se considera como un combustible limpio y no contaminante en comparación con otros tipos de combustibles gaseosos como metano (CH₄). Igualmente, el H₂ puede ser usado como reactivo en procesos de hidrogenación para producir compuestos de bajo peso molecular, crackeo de hidrocarburos, remoción de nitrógeno, sulfuros y cantidades traza de O₂ para prevenir la oxidación y la corrosión, y también como refrigerante en generadores eléctricos (Balat y Kirtay, 2010).

Inicialmente, la producción de H₂ se realizaba por métodos convencionales empleando petróleo como materia prima. Entre los métodos convencionales se encuentran: i) el reformado de gas natural con vapor, ii) craqueo térmico del gas natural, iii) oxidación de hidrocarburos pesados (nafta), y iv) gasificación de carbón mineral (Balat y Kirtay, 2010). Posteriormente, se empezó a utilizar la biomasa como fuente de energía primaria para la producción de H₂, mediante tecnologías como la pirolisis o gasificación para obtener una mezcla de gases (CH₄, CO₂, CO, N₂ y H₂) en estado más puro y con los cuales fuera más fácil su extracción (Laborde y Rubiera, 2010).

Finalmente, en respuesta a las emisiones de gases de efecto invernadero y la crisis energética generada por el uso de combustibles fósiles como el petróleo, se empezó a usar el agua como una fuente de energía para obtener H₂, desde una perspectiva orientada hacia la conservación del ambiente (Liao, 2013). Fue así como surgieron la electrolisis, fotólisis, termólisis y la producción biológica de H₂ (Bernal et al., 2013). Actualmente, las alternativas biológicas se clasifican en aquellas que dependen de la luz solar (biofotólisis directa y fotofermentación) y las no dependientes (fermentación oscura), como se muestra en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Alternativas biológicas utilizadas en la producción de H₂

| GRUPOS | CLASIFICACIÓN | ESQUEMA |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| DEPENDIENTES DE LUZ SOLAR | Biofotólisis directa. Es un proceso en el que cianobacterias y algas verdes, producen H ₂ a partir de la foto descomposición del agua y reducción de la Ferredoxina y enzimas como la hidrogenasa o nitrogenasa. | |
| | Fotofermentación. En este proceso bacterias fotosintéticas purpuras no sulfurosas producen H ₂ a partir de la reducción de protones por la enzima nitrogenasa. El proceso está impulsado por la energía solar para producir ATP y electrones para reducir la Ferredoxina. | |
| INDEPENDIENTES DE LUZ SOLAR | Fermentación oscura: en este proceso variedades de microorganismos anaerobios utilizan sustratos ricos en carbohidratos para producir H ₂ y ácidos orgánicos (láctico, acético, butírico) y alcoholes (etanol y butanol). | |

Fuente: Hallenbeck y Benemann (2002) y Hallenbeck y Ghosh (2009)

2.2. DIGESTIÓN ANAEROBIA

Según Campos (1999) la digestión anaerobia es un proceso biológico en el cual un consorcio de diferentes tipos de microorganismos, en ausencia de oxígeno molecular, promueve la transformación de compuestos orgánicos complejos (carbohidratos, proteínas y lípidos) en productos más simples como CH_4 y CO_2 . Dicha transformación sucede a través de cuatro etapas principales, hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, las cuales se describen a continuación y se presentan en un esquema simplificado a través de la Figura 2.1 (Campos, 1999; von Sperling y Chernicharo, 2005; Torres y Pérez, 2011).

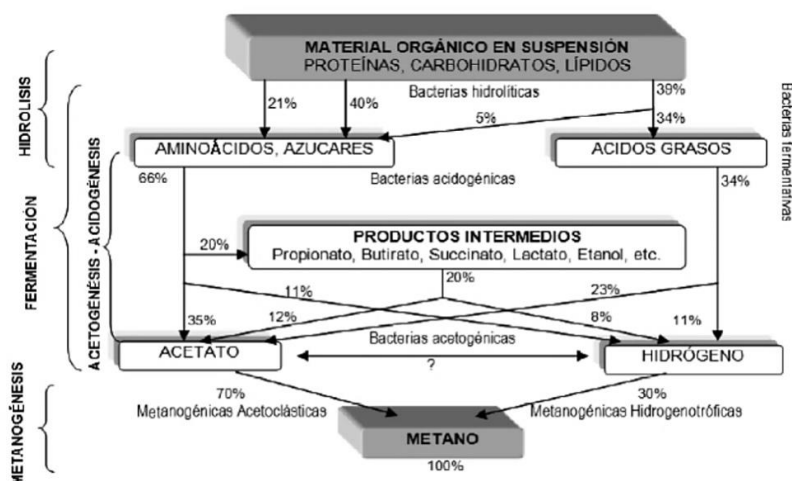


Figura 2.1. Secuencia metabólica y grupos microbianos que intervienen en la digestión anaerobia
Fuente: Campos (1999); von Sperling y Chernicharo (2005) y Torres y Pérez (2011)

Hidrólisis. En esta etapa el material orgánico particulado se convierte en compuestos disueltos de menor peso molecular. Requiere la participación de exo-enzimas que son secretadas por bacterias fermentativas. Las proteínas son degradadas por medio de (poli) péptidos para formar aminoácidos. Los carbohidratos se transforman en azúcares solubles (mono y disacáridos) y los lípidos son convertidos en ácidos grasos de cadena larga (C_{15} a C_{17}) y glicerina. En muchos casos, la velocidad de hidrólisis puede ser una etapa limitante para todo el proceso de digestión anaerobia (Campos, 1999).

Acidogénesis. Los compuestos disueltos generados en el proceso de hidrólisis, son adsorbidos en las células de bacterias fermentativas y después de la acidogénesis, excretadas como sustancias orgánicas simples en forma de ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGVs), alcoholes, ácido láctico y compuestos minerales como CO_2 , H_2 , NH_3 y H_2S (Pavlostathis, 2011).

La acidogénesis es un proceso homólogo a la fermentación oscura, que en la actualidad, está ampliamente relacionado con la producción fermentativa de H_2 (Lee et al., 2008; Robledo et al., 2013). La cual es realizada por un grupo diverso de bacterias anaerobias obligadas (Narasu y Urbaniec, 2012; Tekucheva y Tsygankov, 2012). Sin embargo, algunas especies son facultativas y pueden metabolizar material orgánico por vía oxidativa. En este caso el oxígeno disuelto, eventualmente podría tornarse como una sustancia tóxica para las arqueas metanogénicas sino fuera removido por las bacterias acidogénicas facultativas (Campos, 1999).

Acetogénesis. Es la conversión de productos de la acidogénesis en compuestos que forman los sustratos para la producción de metano, acetato, hidrógeno y dióxido de carbono. Como se muestra en la Figura 2.1, aproximadamente el 70% de la DQO digerida se convierte en ácido acético, mientras que la DQO restante se concentra en la formación de H_2 (Campos, 1999; Pavlostathis, 2011).

Por la estequiometría, dependiendo del estado de oxidación del material orgánico a ser digerido, la formación de ácido acético puede estar acompañada por la síntesis de CO_2 o H_2 . Sin embargo, en

Metanogénesis. En esta etapa el metano es producido por arqueas metanogénicas acetoclasticas a partir de la reducción de ácido acético, o por arqueas metanogénicas hidrogenotróficas a partir de la reducción de CO₂. Como se muestra en las reacciones catabólicas 2.1 y 2.2 (Campos, 1999).

Ecuación 2.1

Ecuación 2.2

Las arqueas que producen metano a partir de H_2 crecen más rápidamente que aquellas que usan ácido acético, de modo que las arqueas metanogénicas acetotróficas generalmente limitan la velocidad de transformación del material orgánico complejo (Campos, 1999).

Según Schink (1997) la sintrofia es un caso especial de simbiosis entre dos tipos de bacterias metabólicamente diferentes, que por razones energéticas dependen entre sí para la degradación de un cierto sustrato. En la metanogénesis, la sintrofia se presenta cuando las cantidades de energía son pequeñas, lo que obliga a los microorganismos involucrados a crear una cooperación de forma eficiente; a tal punto que ninguno puede sobrevivir sin el otro (Madigan et al., 2004).

En ambientes anaerobios las comunidades de microorganismos sintróficos son importantes para la descomposición de la materia orgánica a CO_2 y CH_4 . Posiblemente el paso más difícil sea la degradación fermentativa de los ácidos grasos de cadena corta (acetato, butirato y propionato) ya que la conversión de estos metabolitos a acetato, formato e hidrógeno en cuanto a la energía liberada en condiciones estándar es endergónica, y ocurre solo si los metanógenos logran mantener bajas las concentraciones de estos intermediarios (Müller et al., 2010; Yin et al., 2013).

Por ejemplo, la oxidación sintrófica del butirato según Müller et al. (2010) ocurre a través de la β -oxidación (ver Figura 2.2) y es importante porque a través de esta ruta se logra conocer: i) el mecanismo de la transformación del butirato al complejo Acetoacetyl-CoA, ii) la cantidad de Acetoacetyl-CoA utilizado para la síntesis (regeneración) de butirato y producción de energía en forma de ATP vía fosfotransacetilasa y acetato kinasa, y iii) el momento en el cual ocurre la generación de H_2 .

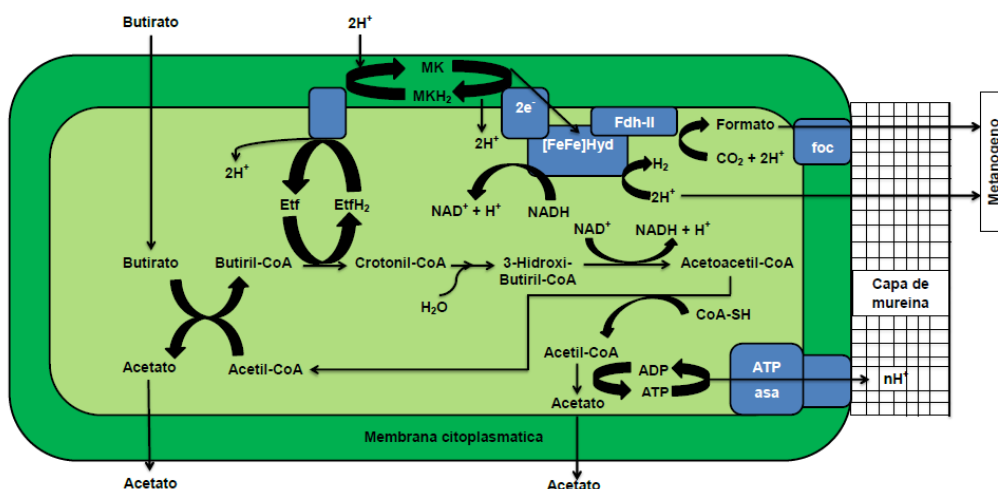


Figura 2.2. Mecanismo de la degradación sintrófica del butirato
Fuente:Müller et al. (2010)

2.4. TERMODINÁMICA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

En el agua residual hay una gran variedad de compuestos orgánicos que pueden ser degradados en reactores anaerobios por una población de microorganismos diversa. La conversión de esos compuestos en metano puede, potencialmente, seguir una gran variedad de caminos catabólicos. Sin embargo, esos caminos son solo posibles en casos que se produzca energía libre en cada uno de los procesos de conversión, o sea, energía aprovechable para los microorganismos durante la reacción. Para cada reacción de la cadena de conversión del material orgánico primario al producto final (CH_4), es necesario que el proceso catabólico genere energía aprovechable para que las bacterias puedan realizar su anabolismo (Campos, 1999).

Si el proceso catabólico no genera energía, el proceso anabólico no ocurre y el metabolismo se torna inviable. Por lo que, las consideraciones sobre la termodinámica de la digestión anaerobia se han restringido al análisis de la variación de la energía libre producida, en algunas de las reacciones importantes en los procesos anaerobio (Madigan et al., 2004) como lo muestra la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Valores de energía libre en reacciones catabólicas de la digestión anaerobia

| PROCESO | ECUACIÓN | $\Delta G(\text{Kj.mol}^{-1})$ |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Propionato a acetato | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + \text{HCO}_3^- + 3\text{H}_2$ | +76,1 |
| Butirato a acetato | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$ | +48,1 |
| Etanol a acetato | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$ | +9,6 |
| Lactato a acetato | $\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$ | -4,2 |
| Acetato a metano | $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{CH}_4$ | -31,0 |
| Bicarbonato a acetato | $2\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O}$ | -104,6 |
| Bicarbonato a metano | $\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$ | -135,6 |

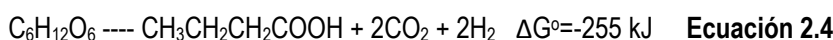
Fuente: Madigan et al. (2004)

Para un buen desempeño de reactores anaerobios es imprescindible que los compuestos orgánicos sean convertidos en precursores inmediatos de CH_4 , o sea, acetato e H_2 . No teniendo esta conversión, tampoco habrá metanogénesis, ocurriendo acumulación de los productos de la hidrólisis (Campos, 1999; Chernicharo, 2007).

La acetogénesis, es la etapa esencial en la conversión de compuestos intermediarios en acetato, y termodinámicamente desfavorable, es decir, no ocurre espontáneamente en sentido de la formación de acetato e H_2 , a menos que esas especies químicas se remuevan del medio (por ejemplo, por metanogénesis), cambiando, así, el equilibrio de la reacción en sentido de la formación de esos productos (Dávila y Razo, 2007; Lamaison, 2012).

Las reacciones acetogénicas son termodinámicamente favorables cuando la presión parcial de H_2 en el medio es muy baja (10^{-4} atm para la conversión de propionato y 10^{-3} atm para butirato), por lo que una vez formados los ácidos propiónico y butírico como productos intermediarios, la conversión en acetato solo será posible mediante la existencia de poblaciones capaces de remover, de forma rápida y eficiente, el H_2 formado en las reacciones acetogénicas (Müller et al., 2010).

Según Khanal (2009a) usando glucosa como sustrato, la producción de H_2 ya sea con acetato o butirato procede como se presenta en las Ecuaciones 2.3 y 2.4.



Como se muestra en las ecuaciones 2.3 y 2.4 la fermentación del acetato y butirato produce 4 y 2 moles de H_2 , respectivamente. Según Hallenbeck y Benemann (2002) esto sucede porque durante la fermentación del acetato, la descomposición del piruvato produce 2 mol H_2 . mol glucosa⁻¹ adicionales a

través de la reducción de la enzima hidrogenasa; siempre que la presión parcial de H₂ se mantenga extremadamente baja ($< 10^{-3}$ atm). Mientras que Khanal (2009a) indica que la pérdida de H₂ sucede porque durante la conversión de Acetil-CoA a butirato los electrones son suministrados por la oxidación del NADH; el cual luego se regenera por los electrones donados por el H₂.

Para la fermentación de un sustrato como la glucosa, tres reacciones metabólicas mediadas por enzimas juegan un rol importante tanto en la termodinámica como en la producción de H₂: i) Reacción catalizada por la enzima lactato hidrogenasa, ii) Reacción catalizada por la enzima NADH hidrogenasa, y iii) Homoacetogénesis.

i) Reacción catalizada por la enzima lactato hidrogenasa

Esta enzima cataliza la síntesis de lactato a partir de los electrones generados durante la producción de H₂ y/o formato. Su presencia está asociada a la disminución del rendimiento de H₂ por la acumulación de piruvato y lactato una vez se supera la capacidad de oxidación metabólica de la glucosa (Bastidas et al., 2012). Desde un punto de vista termodinámico, la energía libre de Gibbs de la síntesis de ácido láctico está directamente influenciada por la concentración intracelular de piruvato y la relación NAD⁺/NADH. Esta reacción no es termodinámicamente favorable cuando la concentración esta próxima a cero y/o la relación NAD⁺/NADH se incrementa (Bastidas et al., 2012).

ii) Reacción catalizada por la enzima NADH hidrogenasa

Esta enzima cataliza la oxidación del NADH para sintetizar hidrógeno. Según Bastidas et al. (2012) para que esto ocurra, la síntesis de H₂ debe considerarse en función de la presión parcial de hidrógeno y de la relación NAD⁺/NADH. En este sentido la producción de H₂ mediante la oxidación del NADH podría en un momento dado poner en riesgo el proceso. Debido a que esta ruta metabólica disminuye la cantidad de NADH que participa en la síntesis de butirato y etanol. Reduciendo la cantidad de ATP producido por la síntesis de butirato y por lo tanto, el ATP necesario para la síntesis de biomasa, por lo que la biomasa podría disminuir con la disminución del ATP (Bastidas et al., 2012).

iii) Homoacetogénesis

La homoacetogénesis reductiva es responsable de la baja producción de H₂, debido a la reacción que ocurre entre el H₂ y CO₂ para generar ácido acético (Dinamarca y Bakke, 2012) como se muestra en la Ecuación 2.5.



Esta reacción es termodinámicamente posible a una presión parcial de H₂ mayor que 0,02 bares y concentraciones de acetato superiores a 10 mM (Bastidas et al., 2012). Sin embargo, mediante la aplicación de un método no invasivo como el lavado con N₂ se puede prevenir su formación y provocar una reacción inversa (oxidación anaerobia del acetato) conocida como acetogénesis oxidativa que aumenta el rendimiento de H₂. Según Bastidas et al. (2012) porque se genera una disminución en la presión parcial de H₂ y CO₂, y se evita la formación cambios hidrodinámicos y estrés en los microorganismos.

2.5. PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A TRAVÉS DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

2.5.1. Presión parcial de hidrógeno

Una de las mayores ventajas de la fermentación como vía para la producción de H₂ es su alta tasa de producción y la amplia gama de sustratos utilizados (Khanal, 2009a). Sin embargo, como proceso presenta una limitación termodinámica que no permite que el rendimiento real sea mayor o igual a 4 mol H₂.mol⁻¹ glucosa (Lee et al., 2008).

Según Levin et al. (2004) y Mandal et al. (2006) la disminución de la presión parcial de H₂ puede considerarse como una alternativa para favorecer termodinámicamente el proceso y su rendimiento. Conceptualmente el principio de Le Chatelier establece que esto sería posible, si uno de los productos gaseosos (H₂ y CO₂) de la reacción de fermentación del acetato se remueve, para que así el equilibrio de la reacción logre desplazarse hacia la derecha, con lo cual se inhibiría el consumo de H₂ (Mandal et al., 2006).

Entre las estrategias empleadas para disminuir la presión parcial de H₂ se encuentran: la mezcla rápida, el burbujeo de otro gas inerte, la aplicación de vacío y el uso de membranas permeables (Khanal, 2009a).

Lay (2000) en un estudio a escala laboratorio reportó un mejoramiento en la producción de hidrógeno incrementando la velocidad de agitación de 100 a 700 rpm, durante la fermentación de almidón en un reactor CSTR, debido a que la mezcla ayuda a disminuir la presión parcial de H₂ y evita la formación de alcoholes. Mizuno et al. (2000) encontraron que la producción puede mejorarse de 1.5 a 3.1 mL H₂.(min. g) biomasa⁻¹ al emplearse como técnica el burbujeo. Park et al. (2005) consiguieron reducir la presión parcial de H₂ en un 87% usando hidróxido de potasio (KOH) para remover el CO₂ almacenado en la fase gaseosa de los reactores, mejorando el rendimiento de H₂ de 1.4 a 2.0 mol H₂.mol glucosa⁻¹.

Hussy et al. (2005) concluyeron que el burbujeo con un gas inerte (nitrógeno) mejora la producción de H₂ en un 60%, y Li y Fang (2007) que la aplicación de vacío y el uso de membranas permeables no mejora la producción de H₂. En este sentido la Tabla 2.3 muestra algunos resultados de referencia, obtenidos al evaluar la producción de H₂ en función de distintas prácticas para disminuir el efecto de la presión parcial de H₂.

Tabla 2.3. Aplicaciones prácticas para disminuir el efecto de la presión parcial de H₂

| PROCESOS | ORGANISMOS | SUSTRATOS | RENDIMIENTO MÁXIMO (mol H ₂ .mol sustrato ⁻¹) | REFERENCIAS |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Batch aplicando Burbujeo de Argón | Enterobacter aerogens | Malosa | 1.6 | Mandal et al. (2006) |
| Continuo aplicando burbujeo de N ₂ | Consortio de microorganismos | Glucosa | 1.43 | Mizuno et al. (2000) |
| Batch aplicando burbujeo de Argón | Citrobacter sp.Y19 | Glucosa | 2.5 | Mandal et al. (2006) |
| Batch usando KOH como trampa de CO ₂ | Clostridium | Lactosa | 2.1 a 3.0 | Mandal et al. (2006) |
| Batch aplicando KOH como trampa de CO ₂ | Consortio de microorganismos | Glucosa | 2.0 | Park et al. (2005) |
| Continuo aplicando burbujeo con CO ₂ | Clostridium tyrobutyricum | Hexosa | 1.68 | Kim et al. (2012) |
| Batch aplicando Lavado con N ₂ | Consortio de microorganismos | Glucosa | 3.25 | Bastidas et al. (2012) |

Un aspecto a tener en cuenta durante la producción biológica de H₂ partir de sustratos orgánicos, es que, se encuentra gobernada por la actividad de la enzima hidrogenasa, la cual cataliza la transferencia de electrones desde una molécula (intracelular) portadora a un aceptor (Angenent et al., 2004b). Por ejemplo, el H₂ es un agente reductor que presenta uno de los potenciales de reducción más altos (E_{H2}=-414 mV), seguido de donadores de electrones intracelulares como la Ferredoxina (E_{Fd}=-400 mV) y el NADH (E_{NADH}=-320 mV). Los cuales se correlacionan con la presión parcial de H₂ a partir de la Ecuación 2.6 propuesta por Angenent et al. (2004a), la cual expresa que a una presión parcial de H₂ alta e igual concentración intracelular de Fd_{reducida}, Fd_{oxidada} y NADH, la producción de H₂ podría tornarse termodinámicamente desfavorable.

$$P_{H_2, \max} \leq \exp \left\{ \frac{2F(E_{H_2} - E_X)}{RT} \right\} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

Dónde:

E_x =Potencial redox del donador de electrones.

F =Constante de Faraday.

R =Constante ideal de los gases.

T =Temperatura absoluta.

Esta correlación indica que para la Ferredoxina, la producción de H_2 es posible siempre que la presión parcial de H_2 sea menor a 0,3 atm (3×10^4 Pa), y para el NADH la presión parcial debe ser menor a 6×10^{-4} atm (60 Pa), para que el NADH pueda ser usado como donador de electrones en la producción de H_2 (Angenent et al., 2004b).

2.5.2. Pre-tratamiento del inóculo

La selección y tratamiento del inóculo es una etapa previa al proceso de producción de H_2 a partir de compuestos orgánicos simples (Glucosa, Sacarosa y Almidón) y complejos (agua residual y residuos sólidos de origen doméstico e industrial) porque afecta tanto la tasa de producción de H_2 como la eficiencia en la eliminación de sustratos (Kannaiah et al., 2013).

Los inóculos pueden ser obtenidos de cultivos puros (*Clostridium* y *enterobacter*) o a partir de cultivos mixtos existentes en ambientes naturales como lodo aerobio o anaerobio de una planta de tratamiento de agua residual doméstica o industrial, compost y sistemas "soilbend" (Wang y Wan, 2009a).

Algunos autores como Wang y Wan (2009a); Tekucheva y Tsygankov (2012); y Narasu y Urbaniec (2012) sostienen que los procesos de producción de H_2 que utilizan cultivos mixtos son más prácticos que los que utilizan cultivos puros, porque los primeros son más simples de operar y más fácil de controlar, pueden recibir una fuente más amplia de sustratos y no requieren la adición de agentes reductores de O_2 (L - Cisteína) externos para mantener un ambiente estrictamente anaerobio (Hafez et al., 2013). Sin embargo, el H_2 producido, posteriormente puede ser consumido por las arqueas metanogénicas (Li y Fang, 2007) debido a que en cultivos mixtos coexisten microorganismos consumidores y productores de H_2 (Valdez y Poggi, 2009).

Para superar este inconveniente, se reportan en la literatura diferentes tipos de pre-tratamiento de inóculos mixtos, las cuales se clasifican en: i) pre-tratamiento químico y ii) pre-tratamiento físico. Del primero hacen parte el pre-tratamiento ácido, básico, cloroformo, sodio 2-bromoetanosulfonato (BES – BESA por sus siglas en inglés), CO_2 e iodopropano. Mientras que la aireación, secado vía infrarrojo y el térmico, entre otros hacen parte del pre-tratamiento físico (Valdez y Poggi, 2009; Srikanth et al., 2010; Kannaiah et al., 2013).

Según Li y Fang (2007) el pre-tratamiento térmico y ácido-básico son los métodos más utilizados y permiten favorecer el predominio de microorganismos productores de H_2 , ya que a través de ellos, no solo se elimina la presencia de microorganismos consumidores de H_2 no formadores de esporas como arqueas metanogénicas, sino que también se favorece la germinación de esporas de aquellos microorganismos productores de H_2 capaces de adoptar esta característica, cuando están expuestos a condiciones ambientales adversas (alta temperatura y pHs ácidos o básicos).

De acuerdo con Kim y Shin (2008) el pre-tratamiento térmico es el más utilizado porque es simple, barato y rápido si se compara con el pre-tratamiento ácido o básico. Para el pre-tratamiento térmico, la temperatura y el tiempo de exposición varía entre 80 y 140 °C y entre 15 y 180 min, respectivamente, mientras que para el pre-tratamiento ácido o básico se requieren por lo menos un día.

Lin et al. (2006) sometieron un lodo acidogénico a un tratamiento térmico con cuatro temperaturas diferentes. El tratamiento térmico de 50 a 60 °C no ayudó en el desempeño de bacterias productoras de H_2 , mientras el tratamiento de 70 a 80 °C aumentó significativamente el contenido de H_2 en el biogás. El

tratamiento térmico de 70 a 80 °C fue efectivo en la eliminación de metanógenos y permitió un rápido restablecimiento de microorganismos acidogénicos.

Nakhla et al. (2008) pre-trataron térmicamente un lodo anaerobio y activado con tres temperaturas diferentes (65, 80 y 95 °C) durante 30 minutos. De las tres temperaturas utilizadas el mayor rendimiento (2.3 y 1.6 mol H₂.mol glucosa⁻¹) se alcanzó a 65 °C. El pre-tratamiento a 80 y 95 °C no fue conveniente porque redujo la diversidad de especies productoras de H₂ y disminuyó la cantidad de H₂, a causa de la formación de ácido láctico.

Chang et al. (2011) evaluaron seis métodos (ácido, base, térmico, aireación, cloroformo y BES) de pre-tratamiento a un lodo activado. De todos ellos el tratamiento con ácido a un pH de 3.0 unidades, fue el mejor y el máximo rendimiento fue de 1.51 mol H₂.mol glucosa⁻¹ debido a la fermentación del ácido butírico. Para este autor, cada tipo de pre-tratamiento genera un cambio en los tipos de fermentación: i) el pre-tratamiento con ácido o base genera la fermentación del ácido butírico, ii) el choque térmico y cloroformo la fermentación de varios ácidos (acético, láctico, butírico y propiónico), iii) la aireación y BES fermentación del etanol. Sin embargo, concluye que el tratamiento con ácido es un método simple y efectivo para garantizar la presencia de microorganismos productores de H₂.

Pattra et al. (2013) aplicaron un pre-tratamiento ácido a un lodo digerido para luego generar H₂ a partir de la fermentación de un agua residual de una industria cervecera. Para el pre-tratamiento ácido utilizaron Ácido Clorhídrico (HCl) 0.5%(m/v) y el inóculo se incubó durante 0, 6, 12, 18 y 24 a 30 °C. Con el pre-tratamiento ácido a las 6 horas se obtuvo el mayor rendimiento de H₂ (42.72 mL H₂.g DQO⁻¹) debido a la eliminación de arqueas metanogénicas, solubilización de carbohidratos y prevalencia de la ruta metabólica del ácido butírico.

De esta manera, se muestra la Tabla 2.4 para identificar los valores de tiempo de exposición, temperatura y pH en las dos principales metodologías de pre-tratamiento citadas anteriormente.

Tabla 2.4. Condiciones de pre-tratamiento térmico y químico (ácido-básico)

| TIPO DE PRE-TRATAMIENTO | DESCRIPCIÓN | TIPO DE INOCULO | REFERENCIAS |
|-------------------------|-------------------------------|-----------------|------------------------|
| TÉRMICO | 100°C 30 min | Lodo digerido | Fang et al. (2006) |
| | 85°C 45 min | Lodo digerido | Azbar et al. (2009) |
| | 90°C 20min | Lodo activado | Kim et al. (2011a) |
| | 100°C 60 min | Lodo digerido | Kannaiah et al. (2013) |
| | 110°C 45min | Lodo digerido | Pattra et al. (2013) |
| ACIDO | pH 3 Unidades por 24 horas | Lodo activado | Chen et al. (2002) |
| | pH 3 Unidades por 24 horas | Lodo activado | Chang et al. (2011) |
| | pH 1 unidades por 6 horas | Lodo digerido | Pattra et al. (2013) |
| BÁSICO | pH 10 Unidades por 24 horas | Lodo activado | Chen et al. (2002) |
| | pH 12.5 Unidades por 24 horas | Lodo activado | Kim y Shin (2008) |

La Figura 2.3 muestra los cambios que ocurren en cuanto a diversidad microbiológica de un inóculo pre-tratado de manera térmica y química. Inicialmente el inóculo presenta una gran diversidad de bacterias endógenas que incluyen tanto bacterias productoras de hidrógeno como bacterias productoras de ácidos y metano. Pero a medida que el inóculo pasa por las distintas etapas del pre-tratamiento el número de arqueas metanogénicas se reduce, mientras que las bacterias productoras de H₂ aumentan (Yasin et al., 2013).

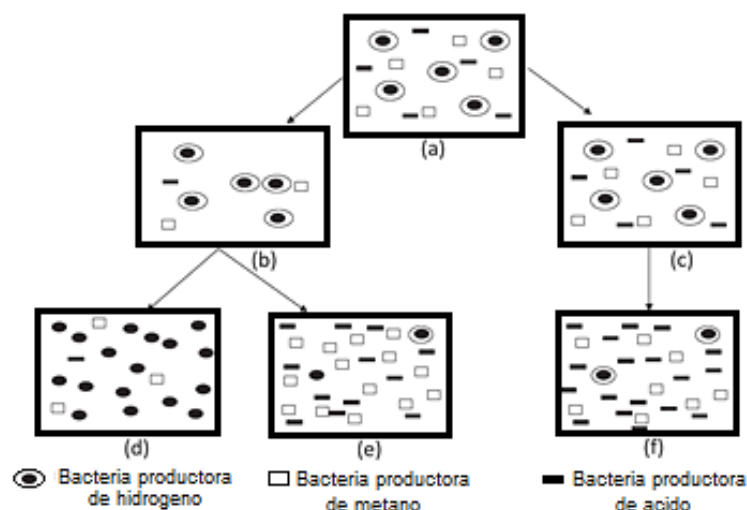


Figura 2.3. Efecto del pre-tratamiento térmico y químico de un inoculo en la producción de H_2 : (a) Inoculo, (b) Inoculo pre-tratado, (c) Inoculo sin pre-tratamiento, (d) Inoculo pre-tratado a pH 5.0 a 6.0 unidades, (e) Inoculo pre-tratado a pH 7.0 a 8.0 unidades, y (f) Inoculo sin pre-tratamiento

Fuente: Yasin et al. (2013)

Maintinguer et al. (2008) indican que el proceso descrito a través de la Figura 2.3, sucede porque existen cierto tipo de bacterias (*Bacillus* y *Clostridium*) que tienen la habilidad de producir una estructura llamada espora (metabólicamente inactiva) cuando son expuestas a condiciones ambientales extremas (calor, radiación, desecación, pH extremos y productos químicos tóxicos). Sin embargo, Valdez y Poggi (2009) afirman que la formación de esporas no es una condición suficiente para garantizar la producción de H_2 , ya que para ello es necesario que estas alcancen la condición de célula activa, a través de una fase de activación, germinación y crecimiento externo, tal como se muestra en la Figura 2.4.

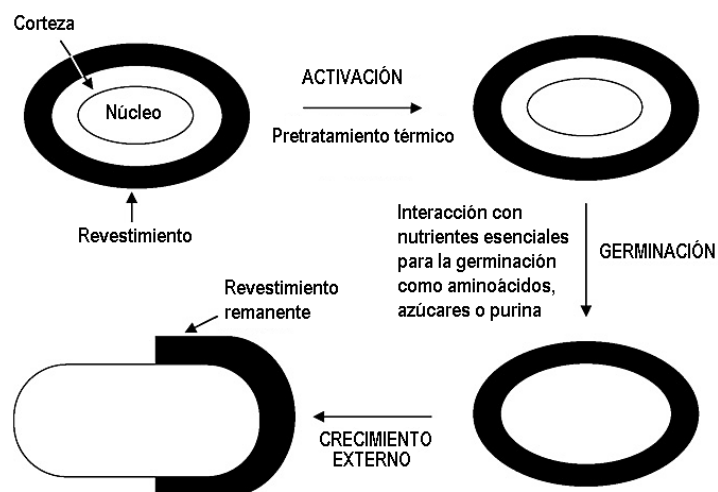


Figura 2.4. Representación gráfica de la transición de una espora a célula activa

Fuente: Valdez y Poggi (2009)

2.5.3. Microbiología de la producción de H_2

Los microorganismos involucrados en la producción de H_2 están clasificados en dos categorías: (a) bacterias anaerobias facultativas (*Escherichiacoli*, *Enterobacter* y *Citrobacter*); y (b) bacterias anaerobias estrictas (*Clostridia*, *Methylophs*). Aunque todos ellos pueden coexistir en un mismo ambiente, hay que

precisar que su abundancia está gobernada por la competencia, disponibilidad de sustrato y condiciones ambientales (Khanal, 2009a). Sung et al. (2002) demostraron que cerca del 70-80% de la población identificada en un bioreactor para producir H₂ estaba conformada por bacterias del género *Clostridium*. En otro estudio realizado por Fang y Liu (2002) empleando glucosa y sacarosa como sustrato, reporto que entre el 65 y 69% de la comunidad de microorganismos pertenecía a *Clostridium*sp.

Las bacterias anaerobias estrictas como los *Clostridium* tienen la habilidad de formar endosporas; las cuales son consideradas como estructuras de supervivencia desarrolladas por estos microorganismos cuando las condiciones ambientales (alta temperatura, desecación, deficiencia de nitrógeno y carbono, y toxicidad química) se vuelven desfavorables (Liu et al., 2011).

Adicionalmente los *Clostridium* son especies capaces de usar diferentes sustratos orgánicos por ejemplo carbohidratos, aminoácidos y lípidos (Hafez et al., 2013). Según Khanal et al. (2004) se pueden clasificar en *C. Proteolíticos* (degradan proteínas y aminoácidos) y *C. Sacarolíticos* (fermentan carbohidratos y producen H₂). Respecto a estos últimos, Khanal (2009a) afirma que *Clostridium butyricum* es uno de los responsables de producir ácido butírico como el principal producto de la fermentación junto con CO₂, acetato e H₂.

En los sistemas biológicos empleados para la producción H₂ a través del metabolismo anaerobio del piruvato intervienen diversas enzimas, las cuales según Hallenbeck y Ghosh (2009) crean todo un sistema que hace posible su degradación, tal como se muestra en las Ecuaciones 2.7 y 2.8 (Khanal, 2009a).

Piruvato-Formato liasa (PFL)

Ecuación 2.7

Piruvato + CoA --- Acetil-CoA + Formato

Piruvato-Ferredoxin Oxidoreductasa (PFOR)

Ecuación 2.8

Piruvato + CoA + 2Fe_{Oxidada} --- Acetil-CoA + CO₂ + 2Fe_{Reducida}

En bacterias entéricas la producción de H₂ sigue el modelo presentado por la Figura 2.5. En esta ruta bioquímica los sustratos ricos en carbohidratos son convertidos a piruvato a través de la glucólisis, posteriormente la enzima PFL genera acetil-CoA y formato. El cual luego es convertido a H₂ y CO₂ por la enzima formato hidrógeno liasa (FHL). En condiciones ácidas (pH bajo) la enzima lactato deshidrogenasa desvía parte de la energía para reducir el piruvato a lactato, y esto genera una disminución en la producción de H₂. Existen evidencias que también es posible la formación de otros fermentados por bacterias entéricas, como el lactato, etanol, acetato, formato, succinato y butanodiol (Khanal, 2009a; Dinamarca y Bakke, 2012).

En bacterias anaerobias estrictas (ver Figura 2.6) la conversión de piruvato a Acetil-CoA tiene lugar por la reducción de la Ferredoxina (Fd) oxidada debido a la enzima piruvato ferredoxina oxido-reductasa. Y posteriormente la hidrogenasa oxida la Fd reducida para regenerar la Fd oxidada y así dar lugar a la formación de H₂ (Hallenbeck y Benemann, 2002; Dinamarca y Bakke, 2012; Mohammadi et al., 2012a).

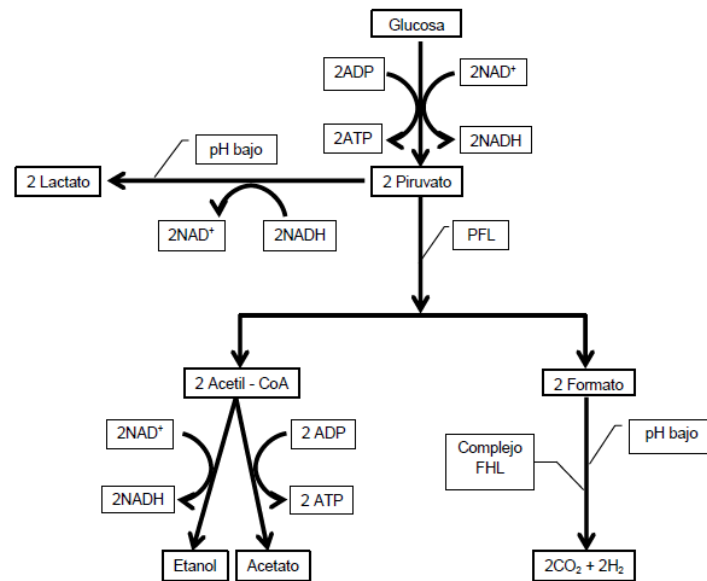


Figura 2.5. Ruta bioquímica en bacterias entéricas para la producción de H_2
Fuente: Li y Fang (2007) y Hallenbeck y Ghosh (2009)

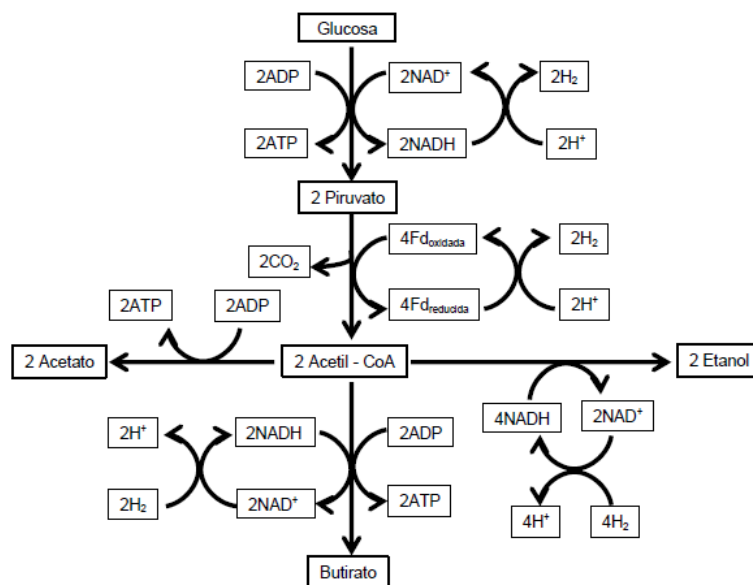


Figura 2.6. Ruta bioquímica en bacterias anaerobias estrictas (*Clostridium*) para la producción de H_2
Fuente: Li y Fang (2007), y Hallenbeck (2009)

Hay una gran variedad de productos finales (etanol, acetato, acetona, butirato, butanol, propionato y propanol) que pueden ser generados a partir de acetil-CoA dependiendo de las especies y condiciones ambientales (Bao et al., 2012). Por ejemplo, para la conversión de acetil-CoA a butirato o etanol se requiere que los electrones sean suministrados por la oxidación del NADH, el cual luego se regenera por los electrones donados por el H_2 . Debido a esto hay que tener en cuenta que durante la fase de producción de alcoholes (etanol o butanol) hay un consumo de H_2 para generar NADH, mientras que durante la fase de producción de ácidos (acetato y butirato) sucede todo lo contrario, hay producción de H_2 . Sin embargo, el rendimiento de H_2 es menor con butirato debido a la pérdida de H_2 (Khanal et al., 2004; Tekucheve y Tsygankov, 2012).

2.6. EFECTO DEL pH EN LA PRODUCCIÓN DE H₂

En la producción biológica de H₂, el pH es una variable de gran importancia porque: i) puede cambiar la ruta metabólica de producción de H₂ a generación de productos reducidos (lactato) y alcoholes (etanol y butanol), ii) puede inhibir el crecimiento de microorganismos consumidores de H₂, y iii) afecta la actividad de la enzima hidrogenasa principal responsable de la producción de H₂ (Zheng y Yu, 2004).

En la ruta metabólica de producción de H₂, la formación de productos finales (etanol, acetato, acetona, butirato, butanol, propionato y propanol) que pueden ser generados a partir de acetyl-CoA, dependen principalmente del pH (Bastidas et al., 2012). Los productos metabólicos más reducidos como el etanol, butanol y lactato, contienen átomos de H₂ que no son liberados como gas. Por lo que, para maximizar el rendimiento de H₂, el metabolismo microbiano debe de ser alejado de la producción tanto de alcoholes (etanol, butanol) como de ácidos reducidos (lactato), y dirigirse hacia la biosíntesis de ácidos grasos volátiles (butirato y acetato) (Hawkes et al., 2002; Levin et al., 2004).

De esta manera, el ajuste del pH puede dar a conocer hacia donde se están dirigiendo las rutas metabólicas. La tendencia que existe a través de los estudios desarrollados en este campo, indican que pHs bajos (4,0 – 4,5 unidades) disminuyen la producción de H₂ porque se re-direccionan las diferentes rutas hacia la producción de lactato, etanol y butanol, mientras que pH's entre 5 y 6 unidades muestran una mejora en la producción de H₂, dado que se obtiene como subproducto principal butirato y acetato (Fang y Liu, 2002; Wang y Wan, 2009a).

En este rango de pH's (5 a 6 unidades) también se inhiben las arqueas metanogénicas que son indeseables en la producción de hidrógeno (Maintinguer et al., 2008). Según Fang y Liu (2002); y Balachandar et al. (2013) esto sucede porque la tasa de producción y la acción de microorganismos consumidores de H₂ están directamente afectados por el pH.

Valores de pHs por debajo de 5 unidades no se consideran apropiados para incrementar la producción de H₂, puesto que se inhibe la actividad de la enzima hidrogenasa (Castro, 2012). Esta enzima cataliza la regeneración del Ferredoxin oxidado y produce H₂, por lo que sin su participación en este proceso no sería posible hablar de una producción teórica de 4 moles H₂ por mol de glucosa (Arias y Rodríguez, 2013). Por todo lo anteriormente expuesto es que la selección de un pH apropiado es crucial para incrementar la producción de H₂ a través de la digestión anaerobia.

El rango óptimo de pH inicial para la producción de H₂ varía conforme al sustrato orgánico utilizado. El rango de pH ideal para la sacarosa es de 4,0 a 4,5 unidades; 4,7 a 5,7 unidades para almidón; 5,5 unidades para la glucosa (Fang y Liu, 2002); 6,0 a 7,0 unidades para xilosa (Lin y Chang, 2004) y 6,0 unidades para agua residual de industrias de alimentos (Oh y Logan, 2005).

Ginkel et al. (2001) usando sacarosa como sustrato obtuvo un rendimiento máximo de 38,9 mL H₂.g DQO⁻¹ a un pH de 5.5 unidades, mientras que Liu y Fang (2003) con el mismo pH inicial consiguieron un rendimiento mayor (270 mL H₂. g sacarosa⁻¹). Por su parte, Khanal et al. (2004) a pH inicial de 4.5 unidades, alcanzaron con sacarosa y almidón un rendimiento de 214 y 125 mL H₂.gDQO⁻¹ respectivamente. Para estos autores el pH inicial influyó favorablemente en el proceso porque impulsó la reacción de la enzima hidrogenasa y la conformación de especies microbianas (*Clostridium*) productoras de H₂.

Aspectos del metabolismo microbiano como utilización de fuentes de carbono, eficiencia en la degradación de sustrato, síntesis de proteínas y liberación de metabolitos son fuertemente influenciados por las variaciones del pH (Zheng y Yu, 2004). Particularmente, en la producción biológica de H₂ el pH inicial afecta las rutas metabólicas del H₂. Según Hwang et al. (2004) este efecto se ve reflejado en la producción H₂ cuando se forman alcoholes (etanol) y AGVs (Butirato y Acetato).

Khanal et al. (2004) usando compost y sustratos orgánicos como almidón y sacarosa y valores de pH inicial entre 4.5 y 6.5 unidades encontraron que el pH entre 5.5 y 5.7 unidades era el rango óptimo para

obtener el mayor rendimiento de H₂ y mejor relación Ácido Acético/Butírico (3:4) para ambos sustratos. Bajo este rango de pH no se alteran las rutas metabólicas hacia la producción de alcoholes.

Lin et al. (2006) evaluarón el efecto del pH inicial en la producción de H₂ empleando xilosa, lodo de una PTAR municipal y un rango de pH inicial de 5.0 a 8.0 unidades, para estas condiciones el pH inicial óptimo fue de 6.5 unidades, con un rendimiento máximo de 1.3 mol H₂. mol xilosa⁻¹, y relación A. Acético/A. Butírico de 1:4. De acuerdo con Godoi (2010) la relación A. Acético/Butírico es un indicador muy sensible a las variaciones del pH inicial, por lo que recomienda conocer muy bien la distribución de subproductos (Ácido acético, butírico, propiónico y láctico) durante la acidogénesis.

Por otra parte, Castro (2012) y Bernal et al. (2013) subrayan en que esto sucede cuando los microorganismos pasan de la fase de crecimiento exponencial (máxima producción de H₂) y alcanzan la fase estacionaria. En consecuencia, las reacciones cambian de una etapa “rica” en la producción de H₂ y ácidos a una etapa de producción de alcoholes. Según Dinamarca y Bakke (2012) este cambio empieza a ocurrir cuando el pH cae a menos de 4.5 unidades y aparentemente es la acumulación de AGVs durante la fase de crecimiento exponencial que induce este cambio.

Con relación a la acumulación de AGVs, Mohan et al. (2013) y Balachandar et al. (2013) explican que la acumulación de metabolitos solubles como el ácido acético, propiónico y butírico en el medio, afecta fuertemente la producción de H₂, porque al aumentar la concentración de metabolitos la fuerza iónica del medio aumenta, ocasionando la lisis de la célula. Jones y Woods (1986) muestran que cuando aumenta la concentración de ácidos, los protones tienden a permear la pared celular de las bacterias productoras de H₂ y generan un desbalance fisiológico en la célula; por lo que para restablecerlo se ven obligadas a re-direccionar su metabolismo, comprometiendo el crecimiento de las bacterias, así como la producción de H₂. Van den Heuvel et al. (1992) y Muñoz et al. (2014) reportan concentraciones inhibitorias de ácido butírico de 50 mM y 41,02±0,5 mM respectivamente.

En la Tabla 2.5 se resumen otras experiencias importantes en las que se han considerado diferentes tipos de sustratos y condiciones de pH inicial en la producción de H₂.

Tabla 2.5. Experiencias relacionadas con la evaluación del efecto del pH inicial en la producción de H₂

| INOCULO | SUSTRATO (A.R) | pH INICIAL | | RENDIMIENTOS ÓPTIMOS DE H ₂ | REFERENCIAS |
|-------------------------------|----------------|-----------------|--------|----------------------------------------|-------------------------|
| | | Rango estudiado | Optimo | | |
| Lodo Anaerobio | Almidón | 4,0 – 7,0 | 5,2 | 1,29 L .g Almidon ⁻¹ | Lay (2000) |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | Almidón | 4.5 – 8.0 | 6.5 | 1.09 mol. mol glucosa ⁻¹ | Fabiano y Perego (2002) |
| Lodo Anaerobio | Almidón | 4,0 - 9,0 | 7,0 | 92 mL.g almidón ⁻¹ | Zhang et al. (2003) |
| Lodo anaerobio | Almidón | 4,0 – 9,0 | 8,0 | 106 mL. g Almidon ⁻¹ | Liu y Shen (2004) |
| <i>Clostridium CGS2</i> | Almidón | 5,5 – 9,5 | 7,5 | 2,0 mol. mol Hexosa ⁻¹ | Chen et al. (2008) |
| Lodo Anaerobio | Almidón | 5,0 – 7,0 | 5,5 | 1,5 mol. mol Hexosa ⁻¹ | Lin et al. (2008) |
| | Almidón | 4.7 – 7.3 | 5.6 | 2 mol. mol hexosa ⁻¹ | Masset et al. (2010) |

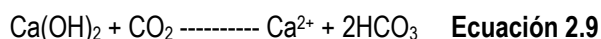
2.7. EFECTO DE LA CAPACIDAD BUFFER EN LA PRODUCCIÓN DE H₂

En un proceso biológico como la digestión anaerobia la capacidad buffer es importante, porque permite asegurar el mantenimiento del pH para el buen funcionamiento del proceso. Esto debido en gran parte, a que en el proceso las arqueas metanogénicas (acetoclasticas) trabajan conjuntamente con las bacterias acidogénicas, regulando la concentración de AGVs en el medio y por lo tanto, controlando el pH durante la fermentación (Rojas, 1987).

De acuerdo con Torres et al. (2011) los reactores anaerobios son muy inestables ante sustratos fácilmente acidificables y con poca capacidad buffer para garantizar el desarrollo de los distintos grupos microbianos involucrados. Por ejemplo, se tiene que el agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca presenta carbohidratos fácilmente hidrolizables que favorecen la fermentación natural y por consiguiente, la formación de AGVs, incidiendo en los bajos valores de pH y prácticamente ausencia de alcalinidad y elevada acidez (Pérez, 2007).

Por tal motivo, es necesario la adición de alcalinizantes que generen capacidad buffer, entre los que se encuentran aquellos que reaccionan con el gas carbónico para formar alcalinidad bicarbonática (Ca(OH)_2 , NaOH , CaO) y los que ofrecen alcalinidad bicarbonática directamente (NaHCO_3 , NH_4HCO_3) (Chernicharo, 2007).

Mediante el uso de cal hidratada (Ca(OH)_2), la producción de bicarbonato se realiza exclusivamente por la presencia del dióxido de carbono como se muestra en la Ecuación 2.9; esta reacción química puede ocasionar vacío al interior del reactor por presiones negativas, debido a la disminución de la presión del CO_2 (Rittman y McCarty, 2001). Adicionalmente, cuando la presencia de CO_2 en el medio es insuficiente para reaccionar internamente con la cal, se puede presentar que el pH final sea demasiado bajo o alto, perjudicando el proceso anaerobio (Chernicharo, 1997).



Por otra parte, el Hidróxido de sodio (NaOH) por ser una base fuerte neutraliza eficientemente los ácidos fuertes, siendo por lo tanto, una solución más satisfactoria para corregir el problema de la neutralización; sin embargo, disminuye la presión de CO_2 en el reactor (Leslie et al., 1996; Chernicharo, 1997). Según Foresti y van Haandel (1998) la desventaja que tiene el hidróxido de sodio, es que no le proporciona capacidad buffer al sistema directamente, porque la única forma en que la genera es a través de la reacción que ocurre con el gas carbónico. De modo que al generarse los diferentes ácidos producto de las reacciones microbiales, el pH puede descender rápidamente, ya que la concentración de bicarbonato que habría en el medio sería insuficiente como para neutralizar a la misma velocidad todos los ácidos formados. La Ecuación 2.10 muestra la reacción entre el CO_2 y NaOH para generar alcalinidad Bicarbonática.



En cuanto al bicarbonato de sodio (NaHCO_3), se tiene que es una sal formada a partir de una base fuerte (NaOH) y un ácido débil (ácido carbónico - H_2CO_3) y como todas las demás sales así formadas, presentan características de sustancias buffer a pHs cercanos a 6,8 unidades (Torres et al., 2011). Este alcalinizante es bastante soluble y no reacciona con el CO_2 , por lo que no se generan problemas de presiones negativas en el sistema. La Ecuación 2.11 muestra la reacción del bicarbonato.



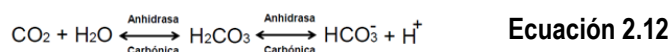
De todo lo mencionado anteriormente, cabe precisar que la información que se tiene sobre el uso de alcalinizantes ha sido enfocada principalmente hacia una digestión anaerobia completa, que involucra la participación tanto de bacterias acidogénicas como de las arqueas metanogénicas. El bicarbonato de sodio ha sido considerado como el principal suplemento de alcalinidad bicarbonática y único en cambiar suavemente el equilibrio del medio para lograr un valor deseado de pH, sin alterar el balance fisicoquímico de la delicada comunidad microbológica (Field et al., 1995).

Autores como Lin y Lay (2004), Wang et al. (2006) y Davila et al. (2011) afirman que cuando se trata de llevar a cabo una digestión anaerobia parcial, con la presencia de bacterias hidrolíticas y acidogénicas para la producción de H_2 , la aplicación de bicarbonato de sodio como buffer debe ser muy bien analizada, ya que durante la acidogénesis, la generación y acumulación de metabólicos ácidos como los ácidos grasos volátiles (AGVs) causa una fuerte caída en el pH del sistema y reduce gradualmente la capacidad buffer por la reacción que ocurre con el bicarbonato (Davila et al., 2011), por lo que si el pH del sistema

no se mantiene en un rango óptimo, se genera como resultado una disminución en la producción de H_2 , junto con un cambio marcado en el metabolismo microbiano (Ginkel et al., 2001; Devi et al., 2010).

Por tanto, la elección del alcalinizante como la determinación de su dosis, es muy importante en la producción de H_2 . Respecto a esto, Mohan et al. (2011) y Mohammadi et al. (2012b) están a favor de usar bicarbonato de sodio como buffer, dado que la reacción que ocurre entre los AGVs y el bicarbonato libera CO_2 (gas). El cual, al entrar en disolución con la fase acuosa ayuda a formar especies químicas como el bicarbonato (HCO_3^-), que contribuyen a aumentar la alcalinidad del sistema.

Un ejemplo de la formación de alcalinidad bicarbonática a partir de la disolución de CO_2 , fue observado por Devi et al. (2010) al evaluar el efecto del burbujeo de CO_2 a distintos periodos (30, 60 y 120 segundos) sobre la producción de H_2 y reducción de la DQO de un agua residual industrial. En efecto, los resultados mostraron que a pH inicial de 6,0 unidades y 30 segundos de burbujeo con CO_2 se lograba obtener el mejor rendimiento de H_2 (3,18 mol H_2 .kg DQO⁻¹) junto con la tercer mejor reducción de DQO (43,44%). Para este autor, el burbujeo con CO_2 permitió desarrollar una alcalinidad natural, que no dejó bajar el pH del medio a niveles inhibitorios para los microorganismos. El mecanismo que se desarrolla se muestra en la Ecuación 2.12.



En la Ecuación 2.12, el CO_2 burbujeado se combina con el agua para formar ácido carbónico (H_2CO_3) a través de reacciones reversibles en presencia de la enzima anhidrasa carbónica. Es por esto que el bicarbonato que se forma, ayuda a resistir los cambios en el pH del sistema durante la producción de AGVs (Bäumchen et al., 2007; Devi et al., 2010).

Lo anterior indica que la presencia de CO_2 (gas) en la fase gaseosa de un reactor, ya sea por la actividad microbiana al liberarlo en el biogás (H_2 y CO_2), la adición de bicarbonato o por el burbujeo con CO_2 (gas), puede reusarse para mantener la capacidad buffer durante la producción de H_2 . Esto podría generar en el reactor, un mejoramiento significativo de la capacidad buffer del sistema, y posiblemente influenciar tanto la producción de H_2 como la degradación del sustrato (Mohan et al., 2011).

A pesar de las ventajas que puede representar el uso de alcalinizantes que contengan el ion bicarbonato (NH_4HCO_3 , $NaHCO_3$) o carbonato (Na_2CO_3) en la producción de H_2 , hay que tener cuidado principalmente porque en la composición del biogás (H_2 y CO_2) generado, el CO_2 tiende a estar en mayor proporción que el H_2 , debido precisamente a la correlación que existe entre el ion bicarbonato y el CO_2 (Lin y Lay, 2004). Esto es un aspecto negativo, puesto que se genera la necesidad de someter a tratamiento el biogás, para obtener H_2 en un grado de pureza más alto, lo cual lleva implícito una inversión económica (Wang et al., 2006). Adicionalmente, Dinamarca y Bakke (2009) y Saady (2013) subrayan que una mayor proporción de CO_2 en la fase gaseosa favorece rutas bioquímicas como la homoacetogénesis, donde se genera consumo y por tanto bajo rendimiento de H_2 .

De esta manera, para generar una mayor relación H_2/CO_2 en la fase gaseosa de un reactor anaerobio y evitar los inconvenientes mencionados, se recomienda el uso de un buffer de fosfatos (sal), puesto que hace parte de uno de los componentes más importantes del sistema ácido-base, comúnmente presente en sistemas de tratamiento anaerobio del agua residual (Lettinga, 1995), y sobre todo, porque no reacciona con los AGVS generados durante la acidogénesis (Davila et al., 2011).

Lin y Lay (2004) realizaron un estudio, en el que evaluaron el efecto de la concentración de distintos buffer de carbonato (NH_4HCO_3 , $NaHCO_3$ y Na_2CO_3) y fosfato (Na_2HPO_4 y K_2HPO_4) en la producción de H_2 . Para esto emplearon sacarosa (sustrato) y lodo anaerobio procedente de una PTAR. La condición óptima se obtuvo con Na_2HPO_4 en una concentración de 600 mg.L⁻¹, generando un rendimiento máximo de 1,68 mol H_2 .mol Sacarosa⁻¹. Según el autor esto fue el resultado de que el buffer de fosfato redujo la fase o periodo de latencia de la curva de producción acumulada de H_2 , y a su vez, constituyó una fuente importante de fósforo y capacidad buffer en el medio. El NH_4HCO_3 no fue conveniente porque en altas concentraciones aumentó la cantidad de amonio, incrementando el grado de toxicidad para los

microorganismos, mientras que el NaHCO_3 aumentó la concentración de CO_2 (gas) y por tanto, redujo el contenido de H_2 en la fase gaseosa.

Davila et al. (2011) evaluarón el efecto de la composición de dos buffer; uno compuesto principalmente por carbonatos (NH_4CO_3) y otro por fosfatos ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, Na_2PO_4 y K_2HPO_4). El sustrato empleado fue un A.R. procedente de una industria láctea; el inoculo un lodo granular anaerobio y la evaluación se realizó a pH inicial de 7,5 unidades. Los resultados mostraron que el mejor rendimiento de H_2 ($1,8 \text{ mol H}_2.\text{mol lactosa}^{-1}$) se obtuvo con el buffer de fosfatos, porque la concentración de ácido butírico ($0,24 \text{ mmol.L}^{-1}$) producido durante la fase de crecimiento exponencial, no fue lo suficientemente alta ($2 \text{ a } 30 \text{ mmol.L}^{-1}$) como para que ocurriera la inhibición de bacterias productoras de H_2 . Esto permitió un mejor consumo del sustrato y que el descenso (Δ) del pH en el medio al inicio y final del experimento ($\pm 2,1$ unidades) fuera menor que el obtenido con el buffer de carbonatos ($\pm 2,6$ unidades).

En la Tabla 2.6 se presenta un resumen de otras experiencias que demuestran el uso de buffer de carbonatos y fosfatos, y condiciones de pH inicial en producción de H_2 .

Tabla 2.6. Experiencias relacionadas con el uso de buffer en la producción de H_2

| INOCULO | SUSTRATO (A.R.) | pH INICIAL | BUFFER | | RENDIMIENTO DE H_2 | REFERENCIA |
|--------------------------------|--------------------|---------------|---------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|
| | | | TIPO | CONCENTRACIÓN (g.L^{-1}) | | |
| Lodo G. Anaerobio | Almidón | 8,0 | Na_2CO_3 | 4,0 | 194 mL. g Almidon ⁻¹ | Liu y Shen (2004) |
| Lodo Anaerobio | Almidón | 5 – 5,5 | Na_2HPO_4 | 11,867 | 0,97-1,43 mol. mol hexosa ⁻¹ | Wang y Chang (2007) |
| Lodo G. Anaerobio | Almidón | 5,0 | NH_4CO_3 | 5,24 | 1,1 mol. mol Hexosa | Lin et al. (2008) |
| | | | K_2HPO_4 | 0,125 | | |
| | | | NaHCO_3 | 6,720 | | |
| Lodo G. Anaerobio | Almidón | 6,0 | NaHCO_3 | 6,0 | 0,89 mol. mol hexosa ⁻¹ | Luo et al. (2010b) |
| Cepas de <i>Clostridium</i> | Almidón | 7,5 | Na_2PO_4 | 5,1 | 2,0 mol. mol hexosa ⁻¹ | Masset et al. (2010) |
| | | | NaOH | 1% (p.v ⁻¹) | | |
| Lodo G. Anaerobio | Almidón | 7,0 | K_2HPO_4 | 0,063 | 250 mL. g SSV ⁻¹ | Lamaison et al. (2014) |
| | | | Na_2CO_3 | 1 | | |
| | | | NaHCO_3 | 1,465 | | |

2.8. SUSTRATO

En un proceso biológico el sustrato es el elemento a partir del cual los microorganismos toman la energía y los nutrientes necesarios para su crecimiento (Yasin et al., 2013). Actualmente, la literatura indica que los sustratos empleados en la producción biológica de H_2 se obtienen principalmente de residuos sólidos y líquidos generados en industrias dedicadas a la producción de alimentos (Wang y Wan, 2009a), así como de la fracción orgánica de los residuos sólidos municipales (Valdez y Poggi, 2009).

Sin embargo, dada la diferencia en cuanto a la composición de carbohidratos, proteínas, lípidos, y celulosa que presentan estos residuos; existen factores limitantes como la tasa de hidrólisis, que afectan considerablemente el proceso y que por ende no permiten que todos los sustratos sean utilizado de igual forma, sino es bajo condiciones especiales tal como un pre-tratamiento del inoculo y/o mediante el control del pH (Yasin et al., 2013).

• A.R PROVENIENTE DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA

El almidón es un carbohidrato que se obtiene a partir de la yuca. Es muy versátil en todas sus aplicaciones y por lo general se utiliza en el sector doméstico e industrial para elaborar productos alimenticios (harina de yuca), químicos y textiles entre otros (Alarcón y Dufour, 1998).

En Colombia, la producción de almidón de yuca se lleva a cabo en pequeñas y medianas industrias denominadas rallanderías, y hace parte de una las actividades económicas más importantes en el norte del Departamento del Cauca. El proceso consiste en una serie de operaciones que, por vía húmeda, logra la extracción del almidón contenido en las raíces de la yuca (Torres et al., 2006). La Figura 2.7 muestra las etapas del proceso de extracción y los residuos sólidos y líquidos generados.

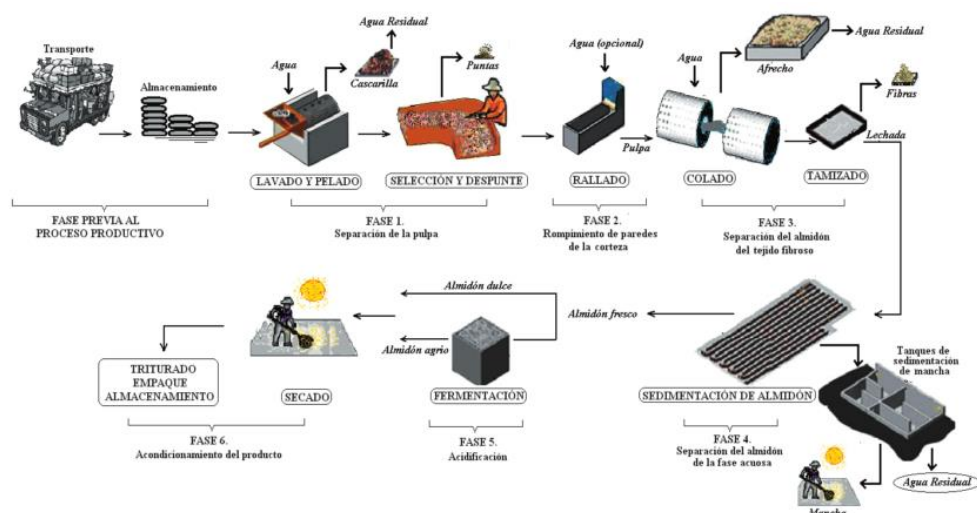


Figura 2.7.Diagrama del proceso de extracción de almidón de yuca
Fuente:Torres (2010)

En este proceso la etapa que genera el mayor volumen de A.R (80%) y la mayor carga contaminante por la separación del almidón y la mancha (almidón de menor calidad) es la sedimentación. El agua residual se caracteriza por ser fácilmente acidificables, bajos niveles de pH (4,1 – 5,5 unidades) y prácticamente ausencia de alcalinidad bicarbonática (0 a 10 mg.L⁻¹ CaCO₃), además de elevada acidez (400 a 1.500 mg.L⁻¹ CaCO₃) (Torres et al., 2006;Pérez y Torres, 2011).

Según Torres et al. (2006) el agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca tiene un potencial de tratamiento biológico grande, no solo porque la relación DBO/DQO presenta valores cercanos a 0.50, sino también porque las altas relaciones DBO_F/DBO_T (0,85 a 0,99) y DQO_F/DQO_T (0,80 a 0,95) y el elevado índice de sólidos disueltos (1.745 a 2.320 mg.L⁻¹ SD) indican la predominancia de materia orgánica en forma soluble. Los niveles de nitrógeno y fósforo garantizan tanto la relación DQO:N:P (1.000:5:1) (Speece, 1996;Chernicharo, 1997) como el exceso sobre los requerimientos mínimos recomendados de 50 mg.L⁻¹ N y 10 mg.L⁻¹ P (Rittman y Mc.Carty, 2001) para el buen desempeño del tratamiento biológico anaerobio de A.R fácilmente acidificable. Las concentraciones de cianuro (0,1 a 0,4 mg.L⁻¹ CN⁻) y fenoles (0,05 a 0,06 mg.L⁻¹ Fenol) se encuentran en límites inferiores a los niveles considerados inhibitorios en procesos biológicos (Field et al., 1995;Rittman y Mc.Carty, 2001).

En la digestión anaerobia, el tratamiento biológico del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca fácilmente acidificable resulta ser una opción tecnológica muy atractiva, porque la materia orgánica fácilmente se descompone y genera subproductos energéticos (H₂ y CH₄) que al aprovecharse de la mejor manera pueden generar beneficios económicos y ambientales en cualquier industria que se dedique a la extracción de almidón de yuca

Generalmente, el tratamiento biológico anaerobio se realiza en varias etapas por la acción de diferentes grupos de bacterias que actúan en forma simbiótica, pero que, por las limitaciones que presentan en una o más de las etapas, algunos autores (Campos, 1999;Intanoo et al., 2014) han llegado a pensar en la posibilidad de separarlas, no solo para tratar de controlarlas mejor, sino también para sacar provecho de los vectores energéticos (H_2 y CH_4) que se generan durante el proceso.

Específicamente, los procesos anaerobios de fases separadas, se caracterizan por una separación física de las etapas de hidrólisis y acidogénesis que se realizan en un reactor hidrogenotrófico, y de las fases de acidogénesis y metanogénesis que se desarrollan en un reactor metanogénico. Puesto que, lo que se busca es la optimización de las condiciones ambientales y de manejo, operación y control. De tal forma que sean propicias para cada uno de los grupos de bacterias involucradas en las diferentes fases (Chernicharo, 2007).

Por ejemplo Cappelletti et al. (2011) operaron el efecto de la concentración inicial de sustrato (5.0, 7.5, 10.7, 15.0 y 30.0 g DQO.L⁻¹) sobre la producción de H_2 y eficiencia de reducción de la DQO (%) durante la fermentación oscura de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. Y encontró que para el proceso, las concentraciones de sustrato más favorables eran 5.0, 7.5 y 10.7 g.L⁻¹, debido a que generaban mayores rendimientos (2.41, 1.2 y 1.34 mol H_2 .mol Glucosa⁻¹) y reducciones de la DQO (33, 25 y 42 %). Mientras que, con las concentraciones de 15.0 y 30 g.L⁻¹ el proceso no logro responder adecuadamente, ya que la producción de ácidos grasos volátiles no disociados llevo el pH del medio a niveles inhibitorios (4,0 unidades) para los microorganismos acidogénicos, lo que se vio reflejado en los bajos rendimientos de H_2 (1.00 y 0,60 mol H_2 .mol glucosa⁻¹) y reducciones de la DQO (35 y 17 %) respectivamente.

Reginatto et al. (2011) operaron un reactor anaerobio en Batch secuencial (ASBR) durante 120 días y alimentado con agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, para evaluar el efecto de la adición de nutrientes sobre la producción de H_2 . Durante los primeros 65 días el proceso se evaluó sin la adición de nutrientes, mientras que entre los 66 y 120 días se evaluó con la adición de nutrientes. Los resultados mostraron que sin la adición de nutrientes el proceso generaba un rendimiento de 323 mL H_2 .g DQO⁻¹, mientras que con la adición producía 153,5 mL H_2 . g DQO⁻¹. Para este autor, la diferencia entre rendimientos fue ocasionada por que la adición de nutrientes (NH_4Cl , K, Na, Mg, Fe, Mn y PO_4) favoreció el crecimiento de bacterias ácido lácticas, las cuales son capaces de secretar ciertos antibióticos o bactericidas que inactivan el desarrollo de bacterias acidogénicas productoras de H_2 .

Lamaison et al. (2014) operaron la eficacia de tres tipos de pre-tratamiento (térmico, lavado y combinado) para enriquecer un lodo metanogénico con bacterias productoras de H_2 , empleando un agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca como sustrato. Los resultados obtenidos por este autor, mostraron que el lavado del lodo como único método de pre-tratamiento fue más efectivo en términos de producción de H_2 , porque garantizo una mayor diversidad de bacterias productoras de H_2 , comparado con el pre-tratamiento térmico; pues este último, así como favorece la selección de bacterias formadoras de esporas como los *Clostridium*, también elimina otras bacterias que pueden contribuir a la producción de H_2 . Específicamente, con el lavado del lodo se consiguió un potencial de producción de 44,6 mL H_2 y un porcentaje de reducción de DQO del 5,4%. En donde gran parte de los resultados obtenidos, fue debido también, a la tasa de dilución que se empleó (0,021 h⁻¹) para enriquecer el lodo con bacterias productoras de H_2 . Puesto que en la operación de reactores Hidrolíticos, para evitar la permanencia de arqueas metanogénicas se recomiendan tasas de dilución superiores a 0,018 h⁻¹ (Valdez y Poggi, 2009).

Por otro lado, cuando el tratamiento de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca se realiza a través de la digestión anaerobia de fases separadas, en el reactor metanogénico, se tiene que además de la producción de Metano, la reducción de la DQO también cobra mucha importancia porque los ácidos grasos volátiles que fueron liberados en alguno momento por bacterias acidogénicas, son asimilados luego por bacterias acetogénicas, que los convierten finalmente en sustratos directos de la metanogénesis.

En este sentido, experiencias como la de Cajigas et al. (2005) muestran por ejemplo, que a pesar de que el agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca se caracteriza por ser un residuo acidificado con alta carga contaminante, su tratamiento por tecnologías anaerobias resulta ser una opción completamente viable para disminuir el grado de contaminación que muchas veces se cierne sobre ríos o fuentes de agua superficiales. Esto autores trabajaron en la operación de un filtro anaerobio a escala de laboratorio para evaluar el efecto de la adición de dos tipos de alcalinizantes (Cal hidratada y Bicarbonato de Sodio) sobre la reducción de la DQO; y encontraron que el bicarbonato de sodio era la mejor opción, porque garantizaba la capacidad buffer necesaria para neutralizar los AGVs, y a su vez el que permitía que hubiera una mayor reducción de la DQO (78 a 81%).

Pérez y Torres (2011) evaluaron la importancia de los índices de alcalinidad (índice IB, índice Al/AP e índice α) en el tratamiento anaerobio de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. La evaluación mostro que en condiciones estables, los valores de los índices deben variar entre 0.20 y 0.35 para el índice IB, 0.40 y 0.55 para el índice Al / AP y estar por encima de 0.65 para el índice α . Sin embargo, de todos ellos el que presentó mayor aplicabilidad para el control del proceso anaerobio fue el índice IB, porque además de ajustarse al rango recomendado en la literatura (Rojas, 2004) mostró una adecuada sensibilidad frente a episodios de inestabilidad del reactor. Por otra parte, la tendencia de los tres índices respecto a la variación en las eficiencias de reducción de la DQO, mostraron que aparentemente existía una relación inversa entre esta variable y los índices IB y Al / AP, y una relación directa con el índice α ; pero que en general, las eficiencias de reducción de la DQO más altas (72 a 90 %) se presentaron al final de cada etapa de arranque, cuando los valores de índices se encontraban en el rango apropiado.

Finalmente Intanoo et al. (2014) evaluaron la producción de H_2 y CH_4 a partir del tratamiento de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, implementando un sistema de fases separadas compuesto por dos reactores UASB (hidrogenotrófico y metanogénico) bajo condiciones de temperatura termofílica (55 °C). Los resultados mostraron que en el UASB Hidrolítico se debía opera con una carga orgánica de 90 kg. DQO.m⁻³.d⁻¹ para garantizar la más alta producción de H_2 en términos del rendimiento (54,22 mL H_2 .g DQO⁻¹), composición (40%) y reducción de la DQO (35%). Mientras que en el UASB metanogénico la carga debida ser de 15 kg. DQO.m⁻³.d⁻¹, para garantizar la mayor producción de CH_4 en términos del rendimiento (164,87 mL CH_4 .g DQO⁻¹), composición (68%), y reducción de la DQO (72%).

Conforme con lo descrito anteriormente, se infiere que la producción de H_2 a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca es factible, gracias a su alto contenido de material orgánico soluble y fácilmente acidificable por microorganismos anaerobios (Castro, 2012). De acuerdo con Cappelletti (2012) y Castro (2012) un A.R con gran contenido de glucosa, sacarosa o almidón, se convierte en un sustrato que favorece la producción de H_2 , porque logra satisfacer los criterios de disponibilidad, costo, contenido de carbohidratos y biodegradabilidad; mientras que sustratos ricos en proteínas y grasas no son adecuados, porque además de presentar bajo rendimiento (por su baja tasa de hidrólisis) requieren del uso de energía extra para ser fácilmente utilizados por los microorganismos (Yasin et al., 2013). Sin embargo, pueden ser adicionados a otros sustratos para incrementar el valor nutritivo (Xiao et al., 2010).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó a escala de laboratorio en las instalaciones de la Universidad del Valle, en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental, adscrito al Área de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. En este trabajo se efectuaron ensayos experimentales que consistieron en evaluar la influencia del pH sobre la producción de hidrógeno en un reactor acidogénico alimentado con agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca.

Dentro del esquema metodológico empleado para evaluar la influencia del pH sobre la producción de H_2 , se definieron aspectos relacionados con la preparación del agua residual (AR) agroindustrial, adquisición y selección del inóculo, configuración de reactores y evaluación, entre otros.

3.1. AGUA RESIDUAL

En el estudio se utilizó un agua residual de características fisicoquímicas similares al agua residual (real) del proceso de extracción de almidón de yuca. En la Tabla 3.1 se presenta la caracterización del agua residual empleada.

Tabla 3.1. Caracterización fisicoquímica del agua residual agroindustrial

| PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS | UNIDADES | VALOR |
|---------------------------------|---------------------------------------------------|-------|
| pH | Unidades | 3,72 |
| Temperatura | °C | 28 |
| Acidez | mg CaCO ₃ .L ⁻¹ | 334 |
| AGVs totales | meq.L ⁻¹ | 27 |
| | mg Ac.acetico.L ⁻¹ | 2.042 |
| Carbohidratos | mg.L ⁻¹ | 491 |
| Orto-Fosfato | mg PO ₄ ⁻³ .L ⁻¹ | 7,79 |
| Nitrógeno Amoniacal Total (NAT) | mg N-NH ₃ .L ⁻¹ | 19 |
| DQO total | mg.L ⁻¹ | 2.671 |
| DQO filtrada | mg.L ⁻¹ | 2.094 |
| SST | mg.L ⁻¹ | 236 |

El agua residual fue preparada en el laboratorio, simulando el proceso de extracción de almidón de yuca y para esto, se definieron aspectos básicos como la cantidad de yuca, volumen de agua y tiempo de sedimentación, tal como sucede en un proceso a escala real. Para la preparación del agua se aplicaron los siguientes pasos:

Lavado y pelado. La yuca se dejó remojar en agua durante 30 minutos para favorecer el lavado y pelado. Transcurrido este periodo de tiempo, se lavó manualmente la yuca con el fin de retirar los residuos (barro y cascarilla) adheridos a su corteza. Después con ayuda de un cuchillo se retiró la capa gruesa o cascara que cubría la yuca y nuevamente, se lavó con agua para eliminar los residuos de tierra adheridos durante el pelado. La Figura 3.1 presenta el procedimiento realizado.

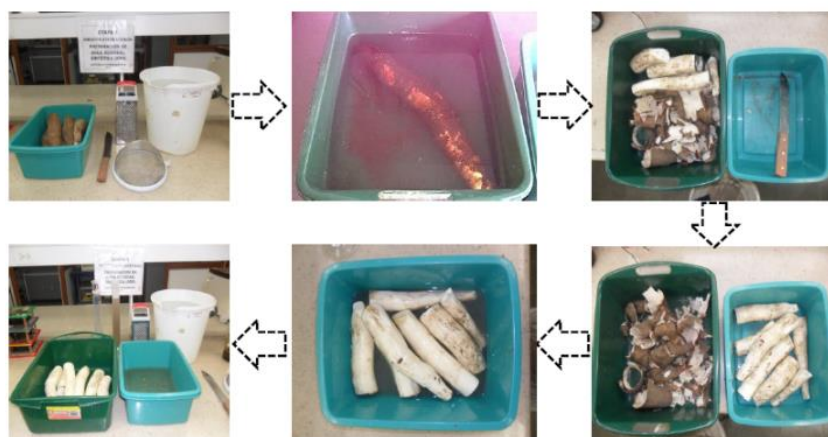


Figura 3.1. Etapa de Lavado y pelado de la yuca

Rallado. La yuca se rayó mediante un rallador de cocina. Después de esto, se obtuvo una pasta que se mezcló con agua potable en un recipiente (tanque de homogenización), al cual se le garantizó una mezcla completa para permitir la liberación de los gránulos de almidón de yuca. La Figura 3.2 presenta el procedimiento realizado.

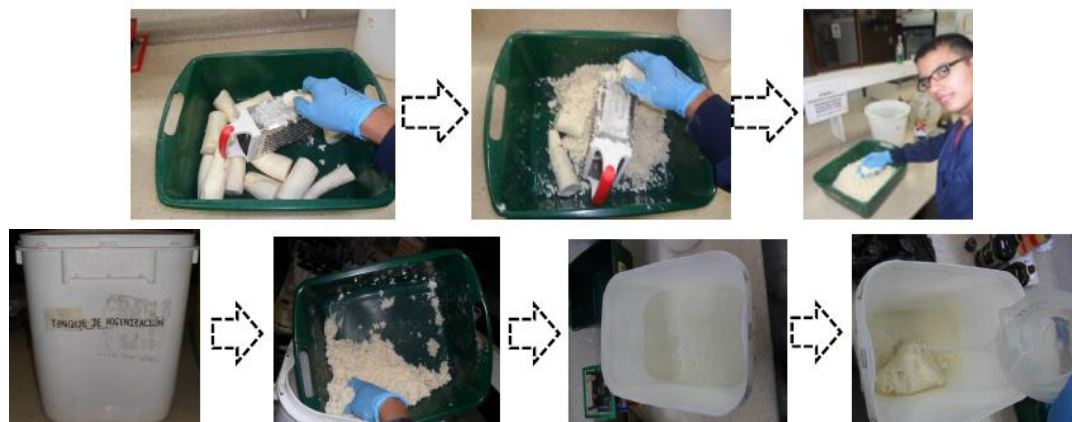


Figura 3.2. Rallado de la yuca y homogenización

Tamizado: una vez que se homogenizó la mezcla, se pasó a través de un tamiz o colador con el fin de separar el afrecho (impurezas finas que no constituyen almidón) de la lechada. En este punto, se mantuvo agitada la mezcla del tanque de homogenización, puesto que las partículas de sólidos tendían a sedimentar rápidamente. La Figura 3.3 muestra el procedimiento realizado.



Figura 3.3. Tamizado o colado de la yuca

Sedimentación del almidón: cuando se tuvo la mezcla del paso anterior completamente colada, se vertió en un recipiente denominado “Tanque de sedimentación”, para fomentar la sedimentación del almidón y la mancha (almidón mezclado con material proteico en suspensión) durante 17 horas.

De acuerdo con Aristizábal y Sánchez (2007) después del periodo de sedimentación generalmente, se presentan tres capas: la capa inferior es el almidón, la intermedia se denomina mancha y la capa superior es agua con trazas de fibra y mancha en suspensión. De esta manera se muestra la Figura 3.4.



Figura 3.4. Sedimentación

3.2. INOCULO

3.2.1. Selección

El inoculo seleccionado para llevar a cabo el experimento, fue un lodo granular metanogénico procedente del reactor UASB de la planta de tratamiento de agua residual del sector cárnico, en la Central de Abastecimiento del Valle de Cauca S.A (CAVASA) ubicada en el kilómetro 11 en la vía Cali – Candelaria.

En la selección del inoculo se tuvieron en cuenta aspectos conceptuales y experiencias locales relacionadas con el uso de lodos granulares en procesos de digestión anaerobia. Entre los conceptuales, la teoría de capas múltiples abrió de cierta manera, las puertas para que se pensara en utilizar un lodo granular como fuente de inoculo para la producción biológica de hidrógeno, debido a la biodiversidad y sintrófia entre microorganismos productores y consumidores de H_2 .

Asociado a esto, experiencias como la de Ramírez (1998) muestran que el lodo de una Planta de Tratamiento de Agua Residual (PTAR) del sector de sacrificio de ganado, en términos de sedimentabilidad (24 m.h^{-1}) es mejor que el de una PTAR doméstica como la de Bucaramanga ($4,5 \text{ m.h}^{-1}$) o Cali ($1,5 \text{ m.h}^{-1}$), ya que presenta una mejor tendencia a la formación de gránulos con buena velocidad de asentamiento, y adicionalmente presenta una diversidad microbiológica anaerobia mejor balanceada, puesto que no exhiben cantidades importantes de bacterias facultativas y sulfatoreductoras que compiten por el sustrato con las arqueas metanogénicas. Por otra parte, este lodo ha mostrado que frente a diferentes sustratos (Acetato, Butirato y H_2/CO_2), genera valores de AME (0.57, 0.37 y $0.15 \text{ gDQO-CH}_4.(\text{g.SVT.dia})^{-1}$) suficientes para catalogarlo como un lodo de buena calidad para un proceso anaerobio (Guyot et al., 1993; Ramírez, 1998). Finalmente, el trabajo realizado por Hurtado y Muñoz (2014) mostraron que este tipo de lodo fue adecuado para la producción de H_2 a través de la fermentación oscura de la glucosa.

3.2.2. Aclimatación

De acuerdo con Pèrez (2007) la aclimatación es uno de los factores más influyentes en el arranque de reactores anaerobios, porque dependiendo del tipo de proceso y de agua residual, se desarrollan condiciones ambientales favorables, que permiten el desarrollo de poblaciones específicas de microorganismos para llevar a cabo el tratamiento eficiente del agua residual. Por esta razón, la aclimatación se realizó para obtener un inóculo enriquecido con bacterias acidogénicas, capaces de transformar los carbohidratos del agua residual en ácidos orgánicos o AGVs. La Tabla 3.2 muestra las características fisicoquímicas del inoculo aclimatado.

Tabla 3.2. Caracterización fisicoquímica del inoculo aclimatado

| PARÁMETRO | UNIDAD | VALOR |
|-----------|-----------------------------------------|-------|
| pH | Unidades | 7,20 |
| ST | g.L^{-1} | 50,93 |
| SV | g.L^{-1} | 38,67 |
| SV/ST | - | 0,76 |
| AME | $\text{mL CH}_4.(\text{g SV.dia})^{-1}$ | 11,04 |

La aclimatación del inoculo se llevó a cabo por 30 días a temperatura y presión ambiente, y para garantizar condiciones anaerobias se empleó un recipiente cerrado de 2,0 Litros. En donde se puso en contacto el inóculo con una mezcla de sustratos compuesta por agua residual del sacrificio de ganado y agua residual agroindustrial. Por recomendación de Rodríguez (2012) el 60% (1,2 L) del recipiente se llenó con el inóculo y el 40% (0,8 L) restante por la mezcla de los dos tipos de agua residual (A.R).

Al inicio de la aclimatación fue mayor la proporción de agua residual del sacrificio de ganado, y a medida que avanzó la aclimatación, se incrementó el contenido de agua residual agroindustrial. De este modo, la composición de la mezcla de sustratos se realizó conforme lo establecido en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Definición del periodo de aclimatación y mezcla

| PERIODO (Días) | MEZCLA DE SUSTRATOS (40 %) | |
|-------------------|----------------------------|------------------------|
| | A.R DE MATADERO (%) | A.R AGROINDUSTRIAL (%) |
| 1 | 80 | 20 |
| 5 | 70 | 30 |
| 9 | 60 | 40 |
| 13 | 50 | 50 |
| 17 | 40 | 60 |
| 21 | 30 | 70 |
| 25 | 20 | 80 |
| 30 | 0 | 100 |

Durante la aclimatación se ajustó diariamente el pH a un valor de 7.0 ± 0.2 unidades mediante la adición de ácido clorhídrico (HCl 1N) o bicarbonato de sodio (NaHCO_3 4%). Para reemplazar la mezcla de sustratos se tomó como referencia reducciones de la $\text{DQO}_{\text{Total}}$ entre 50 a 60%, además de tener en cuenta la respuesta del inóculo en reducir el contenido de carbohidratos e incrementar los AGVs.

3.2.3. Pre-tratamiento

Finalizada la aclimatación se realizaron dos tipos de pretratamiento, para favorecer la esporulación de microorganismos productores de H_2 y eliminar microorganismos metanogénicos consumidores de H_2 . Los pretratamientos seleccionados fueron: i) **Pre-tratamiento térmico**; y ii) **Pre-tratamiento químico**.

Pre-tratamiento térmico. Con base en la metodología utilizada por Hurtado y Muñoz (2014), el pre-tratamiento del inóculo aclimatado se llevó a cabo sometándolo a un choque térmico de 85°C durante 30 minutos. Posteriormente, se almacenó durante un tiempo menor a 24 horas a temperatura ambiente y presión ambiente. La intensidad de la temperatura y el tiempo de exposición utilizados también se soportaron en los resultados de Nakhla et al. (2008) y Mohd et al. (2011).

La Tabla 3.4 muestra las características fisicoquímicas del inóculo con pre-tratamiento termico.

Tabla 3.4. Caracterización fisicoquímica del inóculo pre-tratado

| PARÁMETRO | UNIDAD | VALOR |
|-----------|-----------------------------------------|-------------|
| pH | Unidades | 7,48 |
| ST | g.L^{-1} | 52,93 |
| SV | g.L^{-1} | 39,60 |
| SV/ST | - | 0,75 |
| AME | $\text{mL CH}_4.(\text{g SV.dia})^{-1}$ | 1,18 a 1,43 |

Pre-tratamiento químico. En este pre-tratamiento, se adoptó la metodología de Penteado et al. (2013). Para este caso, el inóculo aclimatado se expuso a una condición extremadamente ácida (pH: 3.0 unidades) durante 24 horas, empleando una solución de HCL 1,0 N. Una vez concluyó el periodo de pre-tratamiento, el pH del inóculo se ajustó a un valor de 6.0 unidades con una solución de Bicarbonato de Sodio al 4% y se conservó a temperatura ambiente y presión ambiente, hasta su posterior uso (< 24h). La Tabla 3.5 muestra las características del inóculo con pre-tratamiento químico.

Tabla 3.5. Caracterización fisicoquímica del inóculo pre-tratado

| PARÁMETRO | UNIDAD | VALOR |
|-----------|-----------------------------------------|-------------|
| pH | Unidades | 5,90 |
| ST | g.L^{-1} | 50,53 |
| SV | g.L^{-1} | 36,87 |
| SV/ST | - | 0,73 |
| AME | $\text{mL CH}_4.(\text{g SV.dia})^{-1}$ | 0,34 a 0,38 |

3.3. MONTAJE EXPERIMENTAL

Para el montaje experimental se emplearon reactores en flujo discontinuo (Tipo Batch) con el objetivo de simular las dos primeras fases de la digestión anaerobia (hidrólisis y acidogénesis). Por esta razón, se denominaron como “Reactor Acidogénico - RA”, como se muestra en la Figura 3.5.

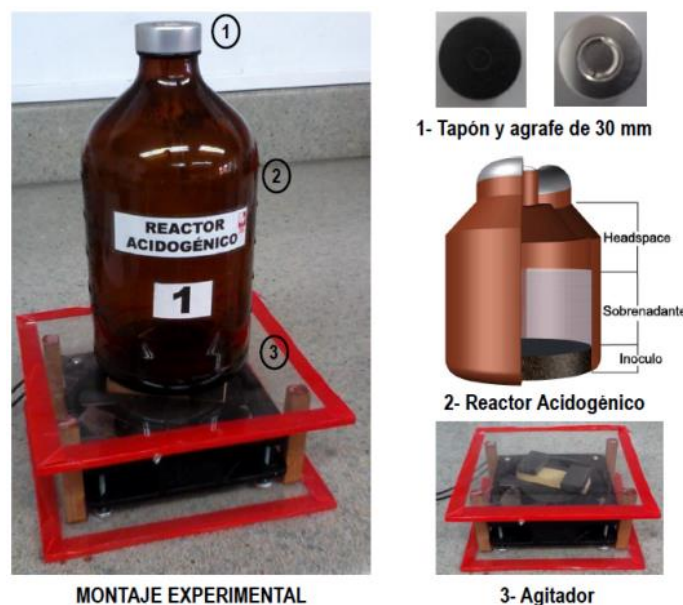


Figura 3.5. Montaje experimental y detalles de sus elementos
Fuente: Elaboración propia

En cada RA se distinguió una fase líquida y una gaseosa. La primera ocupó un volumen útil de 400 mL y estuvo compuesta por la mezcla entre el inoculo y agua residual (Hurtado y Muñoz, 2014). Mientras que en la segunda, el “Headspace” ocupó un volumen de 250 mL.

Durante los ensayos experimentales, cada RA permaneció en constante agitación para garantizar el contacto entre el inoculo (microorganismos) y agua residual agroindustrial (sustrato) y también para favorecer la acumulación de biogás en el “headspace”. Cabe señalar que, para garantizar hermeticidad al interior de cada RA se emplearon tapones y agrafes de 30 mm.

3.4. EVALUACIÓN

El efecto del pH inicial en la producción de H_2 se evaluó en tres niveles pH_1 (5.7), pH_2 (5.4) y pH_3 (5.0), porque estos valores se encuentran dentro del rango óptimo para la formación de productos intermedios (ácidos orgánicos), la actividad de la enzima hidrogenasa y para que las rutas metabólicas se direccionen hacia la producción de H_2 (Fang y Liu, 2002; Trevisan, 2010). Se aplicó una relación Sustrato/Lodo de 2.0 g DQO_{Total} /g SV, con base en una búsqueda literaria (Pakarinen et al., 2008; Trevisan, 2010) donde se reporta este valor para producir H_2 en régimen discontinuo (Batch).

Para la evaluación se caracterizó previamente, tanto el agua residual como los dos inóculos pretratados cada uno con una metodología diferente. Para conocer el volumen de inoculo a adicionar en el RA se aplicó la Ecuación 3.1.

$$V_{Inoculo} = \frac{\left(\frac{DQO_{Total}}{2}\right) * 400 \text{ mL}}{C_{Inoculo}} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Dónde:

$V_{Inoculo}$ = Volumen de inóculo pre-tratado adicionado en RA (mL)

DQO_{Total} = Demanda Química de Oxígeno (mg.L⁻¹) del agua residual medida experimentalmente

2 = Relación sustrato/lodo (g DQO_{Total}/g SV) empleada

$C_{Inoculo}$ = Concentración de SV medida de forma experimental (g.L⁻¹)

400 mL = Volumen útil de RA

Después de esto, se determinó por diferencia el volumen de agua residual adicionada en RA, tal como se muestra en la Ecuación 3.2.

$$V_{AR\ 1:10} = 400\text{ mL} - V_{Inoculo} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Dónde:

$V_{AR\ 1:10}$ = Volumen de agua residual adicionada en RA (mL)

$V_{Inoculo}$ = Volumen de inóculo pre-tratado (mL)

En el RA se mezclaron los volúmenes de agua residual e inóculo y se ajustó el pH inicial. En este punto, fue conveniente que el acondicionamiento se realizara de la siguiente manera:

- Adicionando todo el volumen de inóculo y la mitad del volumen de agua residual, seguido del bicarbonato de sodio o ácido clorhídrico hasta ajustar al pH_{inicial} de evaluación
- Mezclando y dejando reposar hasta acondicionar parcialmente los demás RA
- Completando con la otra parte de agua residual y ajustando de nuevo el pH_{inicial} de evaluación con las soluciones mencionadas

Todo esto permitió que no se adicionara de manera excesiva bicarbonato de sodio o ácido clorhídrico, evitando así afectar drásticamente las condiciones del medio acuoso con valores de pH_{inicial} muy básicos o ácidos. Finalmente, el RA se selló y se puso en mezcla completa, a temperatura y presión ambiente.

Cada condición de pH inicial se evaluó por triplicado. Adicionalmente, cada condición fue acompañada de un blanco (2 réplicas) con su respectivo ajuste de pH. El blanco hace referencia al inóculo pre-tratado disuelto en agua destilada y se empleó para verificar si en estas condiciones también se producía H₂. Ya que en el inóculo se identificó la presencia de otro tipo de sustrato (celulosa) susceptible de ser utilizado por los microorganismos para generar H₂.

Durante el estudio se realizaron en total tres ensayos experimentales (los dos primeros para definir y ajustar el montaje experimental y el último de verificación) cada uno se constituyó de un montaje de 30 reactores representado por tres condiciones de pH (5.0, 5.4 y 5.7 unidades) y dos tipos de pre-tratamiento (químico y térmico), cada uno con tres réplicas (18 reactores) y tres blancos con dos réplicas (12 reactores). Por cada ensayo experimental se tomaron alrededor de 84 muestras para determinar la composición del Biogás. Sin embargo, dadas las limitaciones de infraestructura se determinó únicamente la composición a 12 reactores: 6 correspondientes a los 18 reactores que emplearon agua residual agroindustrial, y las restantes a los 12 reactores (ó blancos) que emplearon agua destilada. En cada uno de los ensayos experimentales el sobrenadante fue caracterizado al inicio y final.

Para tomar las muestras de Biogás y posteriormente caracterizarlas por cromatografía gaseosa, se siguió continuamente la presión total ejercida por el Biogás en el Headspace de RA, la presión en RA se midió con un manómetro (ver Figura 3.6) y la frecuencia con que se tomaron los datos fue en intervalos de 2 a 3 horas durante 15 días, hasta que la presión empezó a hacerse constante (ver Figura 3.7).



Figura 3.6. Medidor de presión (manómetro)

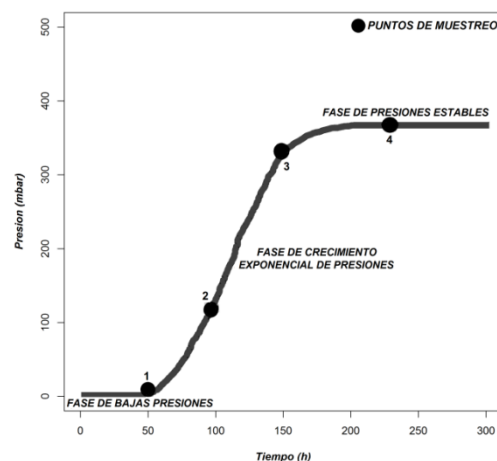


Figura 3.7. Curva teórica de presiones totales
Fuente. Norli et al. (2011) y Pirc et al. (2012)

En la Figura 3.7 se muestra una curva teórica de las presiones totales de Biogás que se empleó en el experimento para prever cómo debían comportarse las presiones reales a medida que se tomaban las lecturas con el manómetro. A partir de este tipo de curvas se identificaron tres fases de crecimiento de las presiones que sirvieron para hacer una adecuada selección de los puntos de muestreo para caracterizar el Biogás acumulado en el Headspace de RA. Teniendo en cuenta que por cada reactor solo se podían tomar máximo 4 muestras de Biogás, se decidió que la muestra No.1 debía ser tomada finalizando la fase de bajas presiones (punto No.1 de la Figura 3.7) dado que en este punto los microorganismos apenas inician la producción de Biogás; la muestra No.2 y 3 en la fase donde las presiones exhiben un crecimiento exponencial (punto No.2 y 3) debido a la rápida conversión del sustrato en Biogás; y la muestra No.4 en la fase donde las presiones tienden a mantenerse estables debido a la baja producción de Biogás (punto No.4).

3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

Teniendo en cuenta que en la digestión anaerobia los microorganismos utilizan simultáneamente la materia orgánica como donador y aceptor de electrones (Aquino y Chernicharo, 2005), se esperaba que durante la evaluación la concentración de carbohidratos disminuyera debido a la actividad de las bacterias acidogénicas, las cuales sustentan su crecimiento a partir de la oxidación y reducción principalmente de carbohidratos, estos compuestos orgánicos se encuentran en un alto contenido en un sustrato fácilmente acidificable como el agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. Paralelamente, se esperaba una disminución en el pH por el aumento de la concentración de AGVs.

De acuerdo con Fernandes et al. (2010) y Dinamarca y Bakke (2012) la canalización de electrones hacia la formación de H_2 disminuye la formación de productos reducidos (etanol y butanol) solubles en agua, que además de contribuir a la DQO en el efluente no serían sustratos directos de la metanogénesis. Por lo que durante la evaluación no se esperaba que una reducción significativa de la DQO.

Agua residual agroindustrial y sobrenadante. Los métodos empleados para realizar la caracterización físicoquímica del agua residual agroindustrial y sobrenadante, se muestran en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Métodos empleados para caracterizar el agua residual agroindustrial y sobrenadante

| PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS | UNIDADES | TÉCNICA DE MEDICIÓN | MÉTODO |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------|----------------------|
| pH | Unidades | Potenciómetro | APHA (2005) |
| Acidez | mg CaCO ₃ .L ⁻¹ | Titulación | APHA (2005) |
| Alcalinidad Bicarbonatica | mg CaCO ₃ .L ⁻¹ | Titulación | APHA (2005) |
| Alcalinidad Total | mg CaCO ₃ .L ⁻¹ | Titulación | APHA (2005) |
| AGVs totales | $\frac{\text{meq.L}^{-1}}{\text{mg Ac.acético.L}^{-1}}$ | Titulación | Field (1987) |
| Carbohidratos | mg.L ⁻¹ | Fenól-Sulfurico | Dubois et al. (1956) |
| Orto-Fosfato | mg PO ₄ ⁻³ .L ⁻¹ | Cloruro estañoso | APHA (2005) |
| Nitrógeno Amoniacal Total (NAT) | mg N-NH ₃ .L ⁻¹ | Digestión y titulacion | APHA (2005) |
| DQO total | mg.L ⁻¹ | Digestión y | APHA (2005) |
| DQO filtrada | | Espectrofotometría | APHA (2005) |
| SST | mg.L ⁻¹ | Gravimetría | APHA (2005) |

Inoculo aclimatado y pre-tratado. Los métodos empleados para realizar la caracterización inicial del inoculo aclimatado y pre-tratado (térmico y químico) se muestran en la Tabla 3.7. Se precisa en que estos se aplicaron únicamente al inicio del experimento.

Tabla 3.7. Métodos para caracterizar el inoculo aclimatado y pre-tratado

| PARÁMETRO | UNIDAD | Técnica de medición | MÉTODO |
|-----------|--------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------|
| pH | Unidades | Potenciómetro | APHA (2005) |
| ST | mg.L ⁻¹ | Gravimétrico | APHA (2005) |
| SV | mg.L ⁻¹ | Gravimétrico | APHA (2005) |
| AME | g DQO.(g SV.día) ⁻¹ | Medición manométrica | Aquino et al. (2007); y Torres y Pérez (2011) |
| AHE | mL H ₂ .(gSV.día) ⁻¹ | Medición manométrica | Trevisan (2010) |

Biogás. Las muestras del biogás generado durante el experimento se colectaron en viales al vacío de 20 mL y se llevaron al Laboratorio de Saneamiento Ambiental de la Universidad Militar Nueva Granada. La caracterización del biogás se realizó en términos de H₂, CH₄,CO₂ y N₂ medidos en el cromatógrafo AGILENT 7890A mediante la técnica *Hidrogeno con Argón*. La configuración del cromatógrafo de gases, utilizada para caracterizar el biogás se presenta en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Configuración del cromatógrafo de gases

| VARIABLE | UNIDAD | VALOR |
|-------------------------------------------------------|----------------------|-------|
| Temperatura del inyector | °C | 200 |
| Flujo de purga | mL.min ⁻¹ | 3 |
| Temperatura del detector-TCD | °C | 230 |
| Flujo del carrier (Argón) | mL.min ⁻¹ | 1,5 |
| Flujo de referencia (Argón) | mL.min ⁻¹ | 15 |
| Flujo del make up (Argón) | mL.min ⁻¹ | 5 |
| Temperatura del horno | °C | 200 |
| Modo de inyección | Split | 1:50 |
| Jeringa de cromatografía de con sistema luergas tight | mL | 0,5 |
| Columnas capilar Carboxen 1010 plot | - | - |
| Polaridad: sin polaridad | - | - |

3.6. MANEJO DE DATOS

Determinación de la composición del biogás. Para realizar esta determinación se tomaron los reportes o resultados de la concentración (mL) de las muestras de gases y se aplicó la Ecuación 3.3 propuesta por Carminato (2013).

$$C_i = \frac{C_{i(H_2, CH_4, CO_2, N_2)}}{C_{H_2} + C_{CH_4} + C_{CO_2} + C_{N_2}} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Dónde:

C_i = Composición (fracción de volumen) del gas de interés (H_2 , CH_4 , CO_2 y N_2)

$C_{i(H_2, CH_4, CO_2, N_2)}$ = Concentración (mL) de H_2 , CH_4 , CO_2 y N_2 medida en el cromatógrafo **AGILENT 7890^a**

$C_{H_2} + C_{CH_4} + C_{CO_2} + C_{N_2}$ = Sumatoria de la concentración (mL) de H_2 , CH_4 , CO_2 y N_2 medida

Volumen de gas (H_2 , CH_4 , CO_2 y N_2) en el Headspace de RA en condiciones experimentales. Este cálculo se efectuó tomando como información la composición (fracción de volumen) del gas de interés (H_2 , CH_4 , CO_2 y N_2) a condiciones experimentales (CE), y el volumen del Headspace. Las CE se refieren a los valores de presión (atm) y temperatura ($^{\circ}K$) correspondientes a cada tiempo de muestreo. En este sentido se muestra la Ecuación 3.4 para realizar este cálculo.

$$V_{iCE} = V_{H.Space} * C_i \quad \text{Ecuación 3.4}$$

Dónde:

V_{iCE} = Volumen (mL) del gas de interés (H_2 , CH_4 , CO_2 y N_2) en condiciones experimentales

$V_{H.Space}$ = Volumen del Headspace (250 mL) de RA

Volumen de gases (H_2 , CH_4 y CO_2) en el Headspace de RA en condiciones normales. Para esto se tuvo en cuenta la composición de las muestras de gases tomadas del Headspace de RA y las condiciones en las cuales se llevó a cabo el experimento (CE) en términos de presión y temperatura. Esto con el fin de determinar mediante la Ecuación 3.5 el volumen de gases (H_2 , CH_4 , CO_2 y N_2) en Condiciones Normales (273,15 $^{\circ}K$ y 1 atm).

$$V_{iCN} = \frac{(V_{iCE}) * (P_{CE}) * (T_{CN})}{(T_{CE}) * (P_{CN})} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

Dónde:

V_{iCN} = Volumen (mL) del gas de interés (H_2 , CH_4 y CO_2) en condiciones normales

V_{iCE} = Volumen (mL) del gas de interés (H_2 , CH_4 y CO_2) en condiciones experimentales

P_{CE} = Presión total (atm) medida con el manómetro en condiciones experimentales

P_{CN} = Presión (1 atm) en condiciones normales

T_{CE} = Temperatura ambiente ($^{\circ}K$)

T_{CN} = Temperatura (273,15 $^{\circ}K$) en condiciones normales

Rendimiento de H_2 . este cálculo se realizó teniendo en cuenta la producción máxima (mol) de H_2 y la cantidad de carbohidratos consumidos (mol Glucosa). La Ecuación 3.6 muestra la forma de calcular el rendimiento.

$$Y = \frac{n_i - n_{i(\text{blanco})}}{n_{\text{Carbohidratos}}} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

Dónde:

Y = Rendimiento (mol H_2 . mol Glucosa consumida⁻¹)

n_i = Producción máxima de H_2 (mol)

$n_{i(\text{blanco})}$ = Producción máxima de H_2 (mol) generada por los blancos

$n_{\text{Carbohidratos}}$ = moles de Glucosa consumida

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el análisis estadístico del experimento se empleó un diseño 2x3 factorial. En él cual se utilizaron dos factores (Pre-tratamiento del inoculo y pH inicial) para evaluar el efecto sobre una variable de respuesta (Presión máxima de Biogás). En este sentido, la Figura 3.8 muestra la forma como se organizaron los factores, para realizar las diferentes combinaciones de los niveles de pH inicial (5.0, 5.4 y 5.7 unidades) con los niveles del Pre-tratamiento (Térmico y Químico).

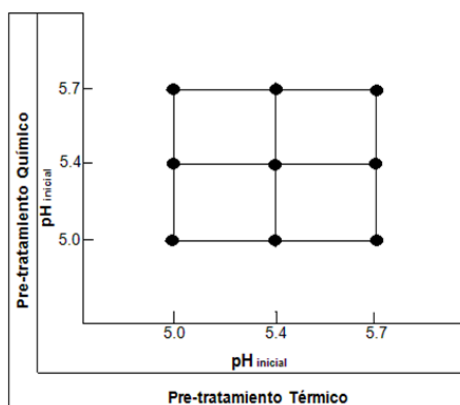


Figura 3.8. Combinaciones de tratamientos en un diseño 2x3 factorial

- **Descripción del modelo estadístico**

En la Ecuación 3.7 se muestra el modelo estadístico formulado para la variable de respuesta.

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \alpha_j + \tau\alpha_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \text{Ecuación 3.7}$$

Dónde:

y_{ijk} = Variable de respuesta Presión Máxima de Biogás (mBar)

μ = Media general

τ_i = Efecto del i-esimo nivel del factor Tipo de pre-tratamiento

α_j = Efecto del j-esimo nivel del factor pH inicial

$\tau\alpha_{ij}$ = Efecto de la interacción entre ambos factores

ε_{ijk} = Error aleatorio

i = 1, 2 Niveles

j = 1, 2, 3 Niveles

k = 3 replicas

- **Pruebas de hipótesis**

Hipótesis nula (H_0). Los factores Tipo de pre-tratamiento, pH inicial e interacción, no afectan significativamente la variable de respuesta Presión Máxima de Biogás.

Hipótesis alterna (H_1). Los factores Tipo de pre-tratamiento, pH inicial e interacción, afectan significativamente la variable de respuesta Presión Máxima de Biogás.

$$H_0: \tau_i = 0$$

$$H_1: \tau_i \neq 0$$

$$H_0: \alpha_j = 0$$

$$H_1: \alpha_j \neq 0$$

$$H_0: (\tau\alpha)_{ij} = 0$$

$$H_1: (\tau\alpha)_{ij} \neq 0$$

- **Pruebas o test estadísticos**

Para evaluar estadísticamente el efecto del tipo de pre-tratamiento, pH inicial e interacción sobre la presión máxima de Biogás, se aplicaron a través del programa Minitab v.16 las siguientes pruebas o test estadísticos: i) Valores individuales, ii) Interacción, iii) Analisis de varianza (ANOVA), iv) Prueba de normalidad, y v) POST ANOVA.

4. ANÁLISIS Y RESULTADOS

4.1. SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA PRESIÓN TOTAL EN REACTORES ACIDOGÉNICOS

Inicialmente, se tenía la expectativa de que el comportamiento de las presiones en todos los reactores empezara con una fase de bajas presiones, debido a la adaptación de los microorganismos a las nuevas condiciones fisicoquímicas del medio; seguida por una fase de crecimiento exponencial de las presiones, gracias a la rápida conversión de la materia orgánica presente en el agua residual en biogás; y terminara en una fase de presiones estables por la baja producción de biogás y poca disponibilidad de sustrato para los microorganismos, tal como se muestra en la curva teórica de la Figura 4.1 (Norli et al., 2011; Pirc et al., 2012).

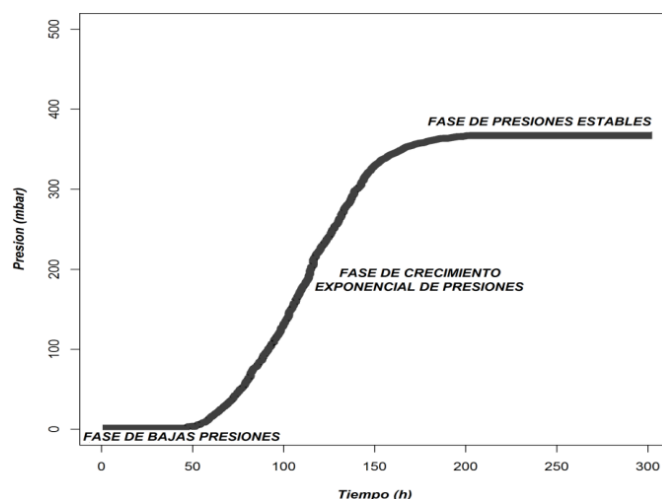


Figura 4.1. Curva teórica de presiones totales

Al comparar la curva hipotética con las curvas obtenidas experimentalmente (ver Figura 4.2 y 4.3), se nota una similitud con cada una de las fases descritas por la Figura 4.1, pero con un comportamiento atípico, debido posiblemente a las variaciones (en forma de zigzag) de las presiones por la temperatura ambiente, y las tasas de producción de biogás.

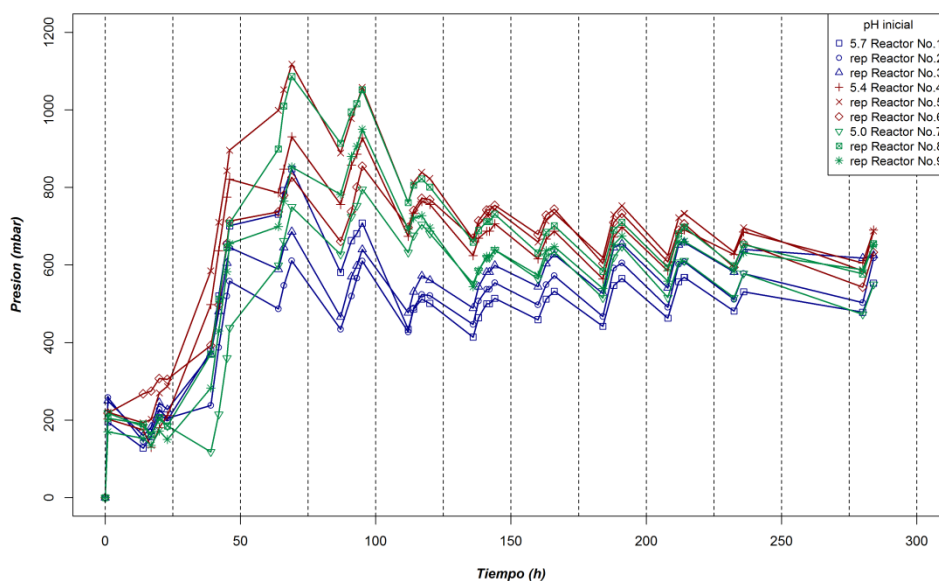


Figura 4.2. Curvas de presión total en reactores con pre-tratamiento químico y pH inicial

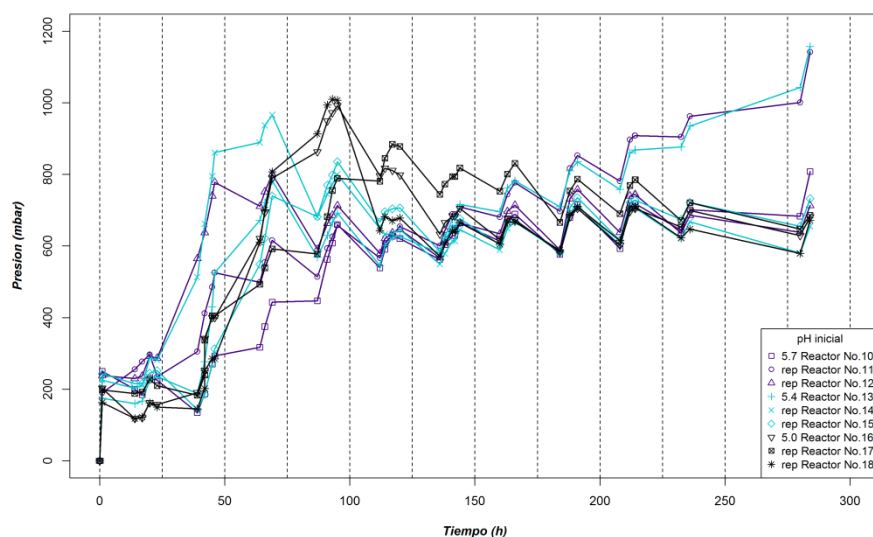


Figura 4.3. Curvas de presión total en reactores con pre-tratamiento térmico y pH inicial

4.1.1. Efecto de la temperatura ambiente sobre la presión total en reactores acidogénicos (RA)

El seguimiento de la temperatura ambiente fue un aspecto muy importante para el experimento, porque se puede asociar con una adecuada utilización del sustrato por parte de los microorganismos para producir biogás (Lettinga, 1995; Khanal, 2009a). De este modo se muestra la Figura 4.4, para representar el comportamiento de la temperatura ambiente a lo largo de todo el experimento.

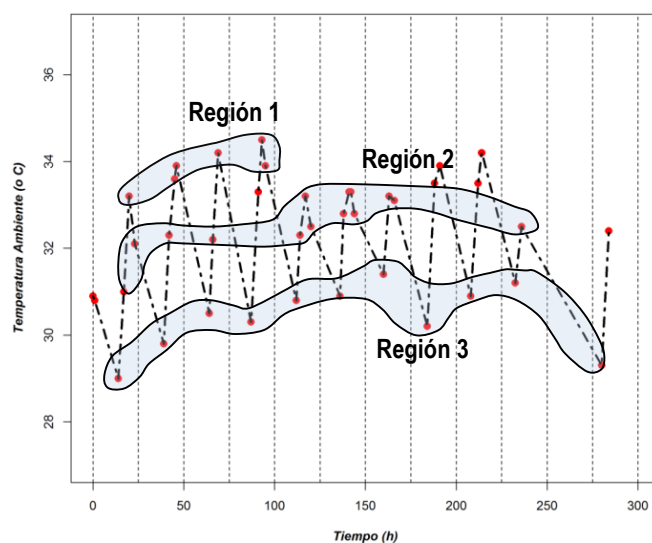


Figura 4.4. Comportamiento de la Temperatura Ambiente

En la Figura 4.4 se pueden distinguir tres regiones (1, 2, y 3) o grupo de puntos, en los que la temperatura ambiente alcanzó de manera repetida un valor máximo (34,5 °C), medio (32,3 °C) y mínimo (29,0 °C) respectivamente. Debido a las oscilaciones diarias que presentó la temperatura, se percibió que cada una de las regiones reflejaban de cierto modo condiciones específicas del clima, que terminaban por afectar el comportamiento de las presiones a ciertas horas del día. Normalmente, en los periodos más calurosos (12:00 pm a 5:00 pm) siempre se notó que la temperatura ambiente alcanzaba sus valores más altos (región 1 y 2) y simultáneamente, la presión total en los reactores lo hacía también. Mientras que en los periodos fríos (6:00 pm a 11:00 am) era lo contrario.

Las variaciones de la presión total a causa de la temperatura ambiente pueden ser explicadas por dos aspectos (biológico y físico). El primero trata sobre la fuerte dependencia de los microorganismos a la

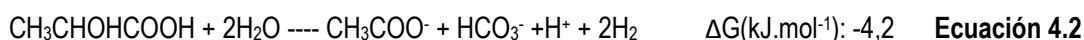
temperatura; mientras que el segundo se asocia a un comportamiento físico del biogás de acuerdo con la teoría cinética molecular de los gases (Brown et al., 2004; Luo et al., 2010c; Saratale et al., 2013).

Con base en lo anterior y en la información entregada por la Figura 4.4 se logró definir que el experimento para la producción de H_2 a través de la fermentación oscura, se desarrolló dentro de un rango de temperatura (29 a 34,5 °C) muy cercano al rango mesofílico (26 a 35°C). Este rango es considerado por algunos autores (Levin et al., 2004; Balachandar et al., 2013) como el adecuado para que los distintos grupos microbianos (bacterias hidrolíticas, acidogénicas, acetogénicas y arqueas metanogénicas) se desarrollen y respondan en términos de la degradación del sustrato, y producción de portadores energéticos como el H_2 y CH_4 .

Se observó que entre las 0 y 100 horas, las presiones crecieron de forma exponencial, y la temperatura ambiente se mantuvo en un rango (34.5 °C) conveniente para el proceso, ya que autores como Khanal (2009b) indican que para que haya una alta tasa de conversión del sustrato la temperatura óptima debe estar próxima a los 35 °C. Entre las 100 y 300 horas, la temperatura se redujo y la presión presentó una disminución pero de una forma lineal, aunque se presentaron oscilaciones importantes.

Un aspecto muy importante que vale la pena recalcar, es que dentro de los periodos mencionados se presentaron cambios o descensos bruscos (1,8 a 3,7 °C) de la temperatura ambiente, que en otras condiciones (limitaciones en la difusión del sustrato, mezcla y estratificación dentro del reactor) hubiesen podido disminuir la actividad de los microorganismos y por ende las presiones. Sobre esto, la WPCF (1987) indica que en la operación de un sistema de tratamiento anaerobio se deben evitar variaciones de la temperatura ambiente que excedan los 0,6 a 1,2 °C, porque la actividad de los microorganismos disminuye cuando la temperatura se reduce. Lo cual, dentro del contexto de la producción biológica de H_2 no es nada conveniente porque la actividad de la enzima hidrogenasa también puede verse afectada (Valdez et al., 2005; Carvajal, 2009; Balachandar et al., 2013).

Sin embargo, a pesar de los cambios presentados por la temperatura ambiente, se observó que la presión no disminuyó en las primeras 100 horas, lo que se atribuye en gran parte, a que en el sistema (inoculo y agua residual) ocurrieron reacciones catabólicas (exotérmicas) que al liberar calor, contribuyeron a mantener la temperatura del sistema en un valor óptimo (por ejemplo 35 °C). De acuerdo con Madigan et al. (2004) esto puede ser posible, si se nota la presencia de ácidos grasos en su forma no disociada tales como el acético y láctico (ver Ecuaciones 4.1 y 4.2), los cuales según Arroyave (1996) son predominantes (aproximadamente 37 y 60 % respectivamente) durante la fermentación del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca.



Adicionalmente, y en concordancia con lo expuesto por la teoría cinética molecular de los gases se tiene que el efecto de un aumento de la temperatura se refleja en el aumento de la presión, porque al aumentar la temperatura aumenta tanto la energía cinética de las moléculas de gas, como la cantidad de choques con las paredes del recipiente que las contienen, y viceversa (Brown et al., 2004).

Aunque en la Figura 4.3 se observa que casi todas las curvas de presión total se vieron afectadas por la temperatura ambiente, para los reactores 11 y 13 esta pudo no haber sido la única variable influyente en el proceso. Se aprecia que a pesar de que se presentaron simultáneamente descensos de la presión y temperatura; las presiones después de las 140 horas siguieron en ascenso. Posiblemente, porque los reactores 11 y 13 en comparación a sus réplicas, presentaron una mayor transformación de la materia orgánica en forma soluble (como los AGVs principalmente) que aumentó la cantidad de biogás en el headspace y las presiones de los dos reactores.

De forma general se puede decir que a pesar de que todos los reactores acidogénicos estuvieron expuestos al mismo efecto de la temperatura ambiente, se notó que los reactores pre-tratados

térmicamente y ajustados en su pH inicial (ver Figura 4.3) recibieron un efecto más favorable que aquellos pre-tratados químicamente (ver Figura 4.2). Ya que después de que las presiones alcanzaron su valor máximo aproximadamente a las 100 horas, las presiones tendieron a mantenerse en esta condición seguramente porque con el pre-tratamiento térmico y los valores de pH inicial establecidos se garantizó una mayor diversidad microbológica, que al estar expuesta ante condiciones de temperatura en el rango mesofílico mantuvieron la dinámica de la producción de biogás durante un tiempo más prolongado. Por ejemplo Mohammadi et al. (2011) evaluaron el efecto de diferentes tipos de pre-tratamientos (térmico, ácido-base y enfriamiento) sobre la producción de H_2 y encontraron que a pesar de que todos los reactores estuvieron expuestos a las mismas condiciones de temperatura (35 °C) y pH (5,5 unidades), el pre-tratamiento térmico fue el que mejor respondió debido a que no solo fue eficiente en la inhibición de microorganismos consumidores de H_2 sino que también proporcionó una mayor diversidad de bacterias productoras de H_2 , lo cual también coincide con lo encontrado por otros autores (Lee et al., 2012; Kannaiah et al., 2013)

4.1.2. Efecto de las tasas de producción de biogás sobre la presión total en RA

Para conocer el efecto de la tasa de producción de biogás sobre el comportamiento de las curvas de presión, se establecieron curvas de producción acumulada de biogás para los reactores acidogénicos. Mediante este tipo de curvas se logró definir la producción de biogás en términos del volumen acumulado (mL) en el headspace de los reactores. Para lo cual, se empleó la base de datos de presiones totales y temperatura ambiente mediante el algoritmo matemático descrito en el Anexo 2 se cuantificó el volumen de biogás producido a lo largo de todo el experimento.

Esta forma de expresar la producción de biogás, ha sido mencionada por varios autores (Monteggia, 1997; Aquino et al., 2007; Torres y Pérez, 2011) para la determinación de tasas y potencial de producción de CH_4 en procesos de digestión anaerobia de residuos sólidos y líquidos. Cuenta con la ventaja de que se elimina el efecto generado por las variaciones u oscilaciones de la temperatura ambiente, de modo que las curvas que se grafican logran describir de manera continua, cómo fue la dinámica de la producción de biogás. La desventaja es que depende de los datos de presión y temperatura ambiente medidos experimentalmente y la imputación del algoritmo matemático puede limitar el análisis estadístico.

En la Figura 4.5 se muestra una curva teórica de la producción acumulada de biogás. Este tipo de curvas se caracterizan principalmente por presentar tres fases de crecimiento (latencia, exponencial y estacionaria) que guardan relación con tres parámetros cinéticos mencionados en el modelo modificado de Gompertz (Khanal et al., 2004; Wang y Wan, 2009b). Específicamente la fase de latencia se relaciona con el parámetro λ , en el sentido de que indican el momento a partir del cual los microorganismos empezaron a producir biogás, luego de un periodo de adaptación al sustrato. Mientras que la fase de crecimiento exponencial y el parámetro R , muestran la tasa ($mL.h^{-1}$) con que los microorganismos produjeron biogás a medida que se alimentaron del sustrato. Y por otra parte, la fase estacionaria y el parámetro P , indican el volumen acumulado de biogás más alto que generaron los microorganismos por el sustrato consumido.

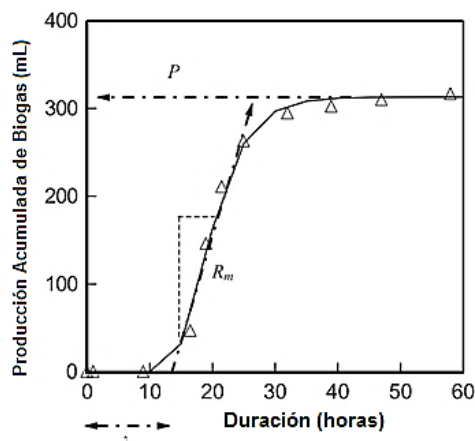


Figura 4.5. Curva teórica de la producción acumulada de Biogás
Fuente: Adaptado de Khanal et al. (2004)

Con base en lo anterior y en la imputación del algoritmo matemático, se obtuvieron series de datos del volumen acumulado (mL) de biogás, que permitieron realizar para todos los reactores acidogénicos las respectivas curvas de producción acumulada de biogás, tal como se muestra en la Figura 4.6 y 4.7.

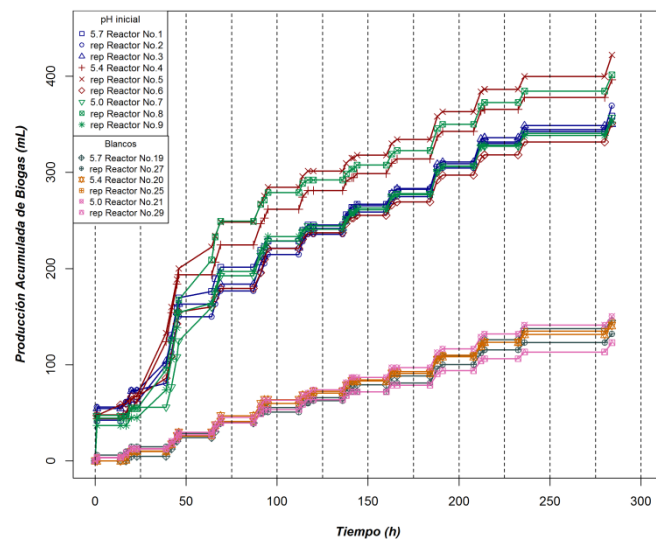


Figura 4.6. Curva de producción acumulada de biogás en RA con pre-tratamiento químico y pH inicial

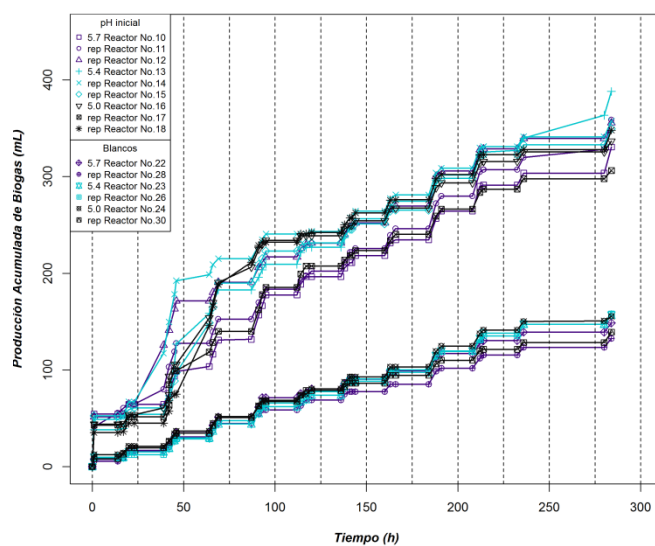


Figura 4.7. Curva de producción acumulada de biogás en RA con pre-tratamiento térmico y pH inicial

Conforme al comportamiento exhibido por las curvas de la Figura 4.6 y 4.7, se identificó que la dinámica de la producción de biogás era similar a la descrita por la curva teórica de la Figura 4.5. Y que por lo tanto, si era posible definirles los parámetros cinéticos del modelo modificado de Gompertz.

En este sentido, se muestra la Tabla 4.1 para conocer los valores de los parámetros cinéticos, de las curvas de producción acumulada de biogás, según el tipo de pre-tratamiento y pH inicial.

Tabla 4.1. Parámetros cinéticos de las curvas de producción acumulada de Biogás

| Tipo de pre-tratamiento | pH inicial (Unidades) | Reactor | λ (h) | R_{\max} (mL.h ⁻¹) | R_{\min} (mL.h ⁻¹) | P (mL) |
|-------------------------|-----------------------|---------|---------------|----------------------------------|----------------------------------|--------|
| Químico | 5,7 | 1 | 14 | 9,9 | 0,89 | 331,74 |
| | 5,69 | 2 | 14 | 10,17 | 1,03 | 329,95 |
| | 5,69 | 3 | 14 | 8,45 | 1,01 | 336,16 |
| | 5,4 | 4 | 17 | 9,98 | 0,95 | 365,51 |
| | 5,39 | 5 | 17 | 9,27 | 0,95 | 386,43 |
| | 5,41 | 6 | 17 | 9,44 | 0,91 | 318,14 |
| | 5,00 | 7 | 39 | 8,72 | 0,85 | 327,22 |
| | 5,01 | 8 | 20 | 9,89 | 0,80 | 372,78 |
| | 5,00 | 9 | 20 | 10,79 | 0,89 | 328,24 |
| Térmico | 5,69 | 10 | 39 | 4,86 | 0,97 | 291,26 |
| | 5,70 | 11 | 1 | 6,48 | 1,04 | 307,31 |
| | 5,70 | 12 | 17 | 6,30 | 0,75 | 328,68 |
| | 5,41 | 13 | 17 | 8,72 | 0,98 | 325,43 |
| | 5,40 | 14 | 17 | 10,17 | 0,79 | 33100 |
| | 5,40 | 15 | 39 | 3,66 | 0,91 | 322,62 |
| | 5,00 | 16 | 39 | 3,48 | 0,76 | 315,70 |
| | 5,00 | 17 | 39 | 1,78 | 0,84 | 286,93 |
| | 5,00 | 18 | 39 | 4,40 | 0,80 | 322,70 |

En la Tabla 4.1 se muestra la tasa máxima (R_{\max}) y mínima (R_{\min}) de las curvas de producción acumulada de biogás de todos los reactores, para explicar por medio de sus valores la manera como puede verse afectada la presión total de los reactores a temperatura ambiente. Para determinar el valor de R_{\max} y R_{\min} en cada una las curvas de producción acumulada de Biogás se seleccionaron dos tramos: el primero comprendido entre las 0 y 100 horas; y el segundo entre las 100 y 300 horas respectivamente. En el primer tramo se trazó una línea recta tangente a cada curva de producción acumulada, posteriormente se determinó la ecuación de la línea recta y de esta se extrajo el valor de la pendiente, el cual corresponde al valor de R_{\max} . Finalmente, en el segundo tramo se procedió de forma similar y se determinó el valor de R_{\min} .

Entre las 0 y 100 horas aparentemente existió una adecuada actividad microbiana para producir biogás porque en este periodo las curvas de presión total de todos los reactores mantuvieron una dinámica creciente, según Norli et al. (2011) cuando las presiones exhiben este tipo de comportamiento quiere decir que los microorganismos se encuentran más activos porque han reconocido el sustrato como una fuente de alimento importante para sus necesidades metabólicas. Con relación a esto, se observa que tanto las curvas de presión (Figura 4.2 y 4.3) como las de producción acumulada de biogás (Figura 4.6 y 4.7) antes de las 100 horas, experimentaron un comportamiento parecido, que aunque no es lineal, si muestra que la presión total guarda cierta proporcionalidad con la tasa máxima de producción acumulada de biogás.

Es decir que posiblemente, todas las curvas de presión total aumentaron sus valores entre las 0 y 100 horas, porque simultáneamente se presentó la tasa máxima de producción acumulada de biogás, que sin importar los descensos que tuvo la temperatura ambiente, logro que el sistema (agua residual y lodo) se mantuviera en un valor óptimo de temperatura (34,5 °C).

Después de las 100 horas, las curvas de presión empezaron a verse afectadas no solo por la tasa de producción acumulada de biogás sino también por la temperatura ambiente. Aunque entre las 100 y 300 horas, todas las curvas de producción acumulada de biogás siguieron creciendo, se observó con base en los valores reportados de la tasa mínima de producción de biogás, que el sustrato con el que inicialmente los microorganismos empezaron a consumir para su desarrollo era limitado, dado que las tasas de producción fueron aproximadamente 4 a 10 veces menores que las tasa máxima de producción de biogás. Por esta razón, las curvas de presión total ya no lograron mantener la misma dinámica de crecimiento, que se observó durante las primeras 100 horas del experimento.

Con base en estas apreciaciones, se infiere que las curvas de presión total son funciones de dos etapas, cuyo comportamiento depende de variables como la tasa de producción de biogás y temperatura ambiente. En donde la primera etapa se describe principalmente por presentar un crecimiento exponencial de las presiones en periodos relativamente cortos (0 a 100 horas), adecuada disponibilidad de sustrato, tasas de producción de biogás altas y en menor medida por la temperatura ambiente. Mientras que la segunda, se describe principalmente por oscilaciones de las presiones en periodos largos (100 a 300 horas), tasas de producción de biogás bajas y una influencia marcada de la temperatura ambiente.

Por otro lado, es muy importante tener en cuenta que tanto las curvas de presión total como las de producción acumulada de biogás, además de ser útiles para hacer una descripción teórica de las distintas fases que acompañaron el proceso, también proporcionaron en términos prácticos, información sobre la forma cómo se debían seleccionar los puntos de muestreo para caracterizar el biogás. Puesto que, lo más conveniente es que el muestreo se realice en la fase donde las presiones o el volumen acumulado de biogás exhiben un crecimiento exponencial.

A pesar de que, durante todo el experimento se trabajó en términos de la producción de Biogás, se consideró que un incremento en el volumen o en las presiones, era debido en gran parte al H_2 que se estaba produciendo, en conformidad con lo expuesto por Bernal et al. (2013) quienes afirman que la mayor cantidad de H_2 se consigue cuando la curva de producción acumulada alcanza la fase de crecimiento exponencial, debido a que el sustrato rápidamente se transforma en AGVs y simultáneamente se libera H_2 .

Conviene subrayar que no se trata de hacer una distinción, sobre el tipo de curva (de presión total o producción acumulada de biogás) que es mejor para monitorear la producción de biogás en los reactores. Si no de entender que la información generada por ambos tipos de curvas es complementaria. De modo que, mientras las curvas de presión total ayudan a proporcionar información más clara sobre el comportamiento físico del biogás que se acumula en el headspace de los reactores; las curvas de producción acumulada ayudan a responder de manera indirecta la actividad que tuvieron los microorganismos en producir biogás en periodos específicos del proceso.

Es claro que estos dos tipos de curvas, guardan algunas diferencias que pueden llegar a incidir sobre su elección. Ya que por un lado, se tiene que aunque las curvas de presión total de biogás no muestran directamente el volumen de biogás producido, si permiten que se haga un buen seguimiento del experimento, porque en función de las dos etapas que caracterizan a este tipo curvas, la presión sí guarda una relación directa con la producción de biogás. Y entre los aspectos a favor que tienen este tipo de curvas, se destaca el hecho de que por la rapidez con la que se grafican, el trabajo en el laboratorio se vuelve más práctico, de modo que se facilita mucho más la ejecución de experimentos con gran número de reactores y sobre todo, la rapidez con la que se realiza el muestreo para la caracterización del biogás.

Las curvas de producción acumulada de biogás resultan ser la opción ideal, porque estas indican realmente el volumen de biogás que se está produciendo. Sin embargo, tienen el inconveniente de que para graficarlas se deben medir primero las presiones y luego ejecutar el algoritmo matemático. Lo cual es poco práctico ante experimentos con gran número de reactores, ya que puede causar demoras en la toma de muestra del biogás y por ende que no se realice adecuadamente el muestreo para su caracterización.

Todas estas observaciones, muestran claramente que la presión total en los reactores acidogénicos, fueron afectadas por las oscilaciones que presentó la temperatura ambiente y las tasas de producción de Biogas durante el experimento. Pero, se enfatiza que estas observaciones no especifican aún las condiciones experimentales “óptimas” que permitan a través de la presión total de biogás, hacerse una idea de la condición con mayor cantidad de H₂ producido.

Por tal motivo, se muestra la Tabla 4.2 para identificar aquellos reactores que dentro de la evaluación con pre-tratamiento (químico y térmico) del inoculo, y ajuste del pH inicial del medio, reflejaron las presiones máximas debido al biogás acumulado en el headspace de los reactores.

Tabla 4.2. Presiones de Biogás en reactores acidogénicos

| Tipo de pre-tratamiento | pH inicial (Unidades) | Reactor | Presión Máxima (mbar) | Promedio de Presión Máxima (mbar) |
|-------------------------|-----------------------|---------|-----------------------|-----------------------------------|
| Químico | 5,7 | 1 | 848 | 715 |
| | 5,69 | 2 | 611 | |
| | 5,69 | 3 | 686 | |
| | 5,40 | 4 | 931 | 968 |
| | 5,39 | 5 | 1118 | |
| | 5,41 | 6 | 855 | |
| | 5,00 | 7 | 795 | 944 |
| | 5,01 | 8 | 1086 | |
| | 5,00 | 9 | 950 | |
| Térmico | 5,69 | 10 | 660 | 706 |
| | 5,70 | 11 | 658 | |
| | 5,70 | 12 | 801 | |
| | 5,41 | 13 | 783 | 861 |
| | 5,40 | 14 | 966 | |
| | 5,40 | 15 | 835 | |
| | 5,00 | 16 | 992 | 962 |
| | 5,00 | 17 | 884 | |
| | 5,00 | 18 | 1010 | |

La información que se muestra en la Tabla 4.2 se utilizó para realizar una primera aproximación relacionada con la condición experimental (tipo de pre-tratamiento y pH inicial) que reflejó de manera indirecta una mayor producción de H₂, teniendo en cuenta las presiones máximas de biogás que se generaron en los reactores, durante la fermentación oscura del agua residual agroindustrial.

4.2. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO TÉRMICO Y DEL pH INICIAL

Para determinar el efecto del tipo de pretratamiento y del pH inicial sobre producción de H₂ se realizó un análisis estadístico, el cual se aplicó únicamente sobre los valores de presiones máximas de biogás, y no sobre los valores de rendimiento de H₂ directamente. Pues en estos últimos, no fue posible contar con replicas que permitieran medir el error y realizar el análisis de varianza (ANOVA) adecuado.

4.2.1. Análisis estadístico

La variable de respuesta con la que se realizó el análisis estadístico fue la presión máxima de Biogás. La cual se evaluó en función de un factor cualitativo (tipo de pre-tratamiento del inoculo) y cuantitativo (pH inicial del medio).

Con base en lo mencionado anteriormente, se tiene que el experimento tuvo un diseño 2X3 factorial compuesto por los siguientes factores (2) y niveles (3): i) tipo de pre-tratamiento (Químico y Térmico), y ii) pH inicial (5.0, 5.4, y 5.7). Los datos empleados para realizar el análisis estadístico son los presentados en la Tabla 4.2.

- **Valores individuales**

La Figura 4.8 muestra los valores individuales de las presiones máximas de Biogás según el tipo de Pre-tratamiento y pH inicial. De acuerdo con esta información, se observa que el tipo de pre-tratamiento no ejerció una influencia significativa sobre las presiones dado que la distribución de los datos al parecer fue la misma. Específicamente, los valores medios de las presiones indicaron que no importa si el pre-tratamiento del inoculo es térmico o químico, puesto que con cualquiera de los dos se consigue el mismo efecto.

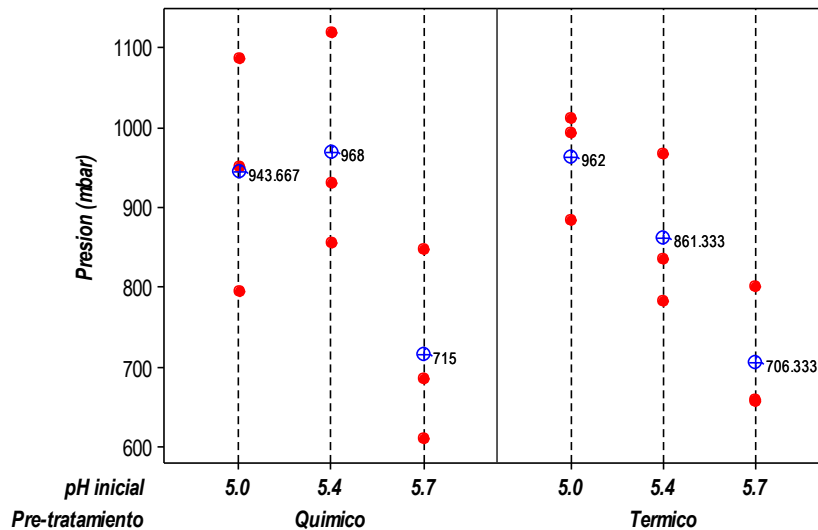


Figura 4.8. Valores Individuales de las Presiones Máximas de Biogás

Con respecto al efecto del pH inicial sobre las presiones, se observa en esta misma figura que sí influyó en el comportamiento de los datos, ya que entre los niveles de pH inicial de 5.0 y 5.4 unidades las presiones fueron más altas, mientras que a pH inicial de 5.7 unidades fue todo lo contrario.

Particularmente, los valores medios indicaron que hubo una mayor producción de Biogás a pH de 5.4 unidades con pre-tratamiento Químico (387 mbar), seguido del pH de 5.0 unidades con pre-tratamiento térmico (385 mbar). Mientras que a pH de 5.7 unidades con cualquiera de los dos tipos de pre-tratamiento (químico y térmico) la producción de Biogás fue más desfavorable (286 y 282 mbar respectivamente).

- **Interacción**

La Figura 4.9 muestra la interacción entre las presiones máximas de Biogás según el tipo de pre-tratamiento y pH inicial. Por la forma como se presentaron las curvas de valores medio, se puede decir que la interacción entre los dos factores (tipo de pre-tratamiento y pH inicial) no fue significativa. Lo cual es muy importante, porque se cumple con un criterio estadístico necesario, para aplicarle a los datos de la Tabla 4.2 su respectivo análisis de varianza (ANOVA).

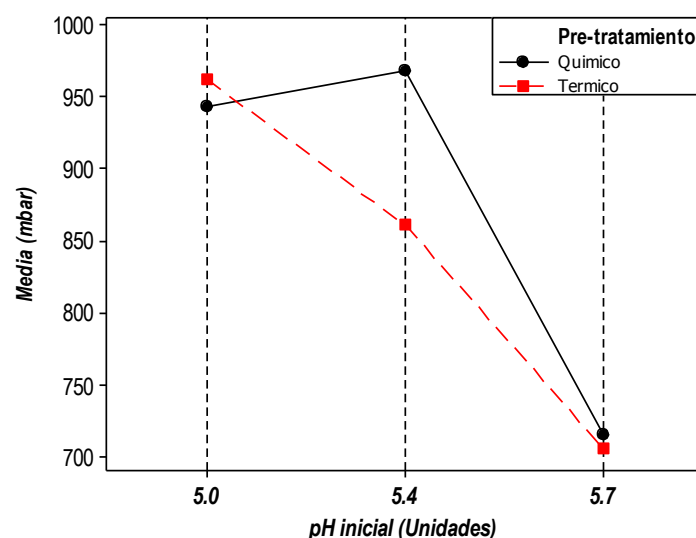


Figura 4.9. Interacción de los valores medios de las Presiones Máximas de Biogás

- **Análisis de varianza**

La Tabla 4.3 muestra los resultados del análisis de varianza (ANOVA) aplicado a los datos de la Tabla 4.2. Cabe mencionar que para realizar este análisis se empleó un ANOVA de GLM (Modelo Lineal General) a través del programa estadístico Minitab v.16.

Tabla 4.3. Cuadro de análisis de varianza para un diseño 2X3 factorial

| Factor | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Suma de cuadrados ajustada | Cuadrado medio ajustado | F | P |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|------|-------|
| Pretratamiento | 1 | 4705 | 4705 | 4705 | 0,38 | 0,550 |
| pH inicial | 2 | 203435 | 203435 | 101717 | 8,20 | 0,006 |
| Pretratamiento – pH inicial | 2 | 12979 | 12979 | 6489 | 0,52 | 0,606 |
| Error | 12 | 148902 | 148902 | 12408 | | |
| Total | 17 | 370020 | | | | |

Para valorar si los factores que se listan en la Tabla 4.3 tuvieron un efecto significativo sobre la variable de respuesta (Presión Máxima de Biogás), se estableció inicialmente un nivel de significancia de 0,05 y posteriormente se comparó con el *p-valor* asociado a cada factor.

De esta manera, se tiene que el efecto de la interacción **Pretratamiento-pH inicial** no ejerció una influencia significativa sobre la variable de respuesta, debido a que el *p-valor* (0,605) fue mayor que el nivel de significancia previamente establecido (0,05). Por otro lado, también se muestra en el análisis que el factor **pH inicial** sí tuvo una influencia significativa sobre la variable de respuesta, ya que el *p-valor* (0,006) fue menor a 0,05. Finalmente, con el factor **Pre-tratamiento** no se observó que ejerciera una influencia significativa sobre la variable de respuesta, puesto que el *p-valor* (0,550) fue mayor que el nivel de significancia.

- **Prueba de normalidad**

La Figura 4.10 muestra la prueba de normalidad empleada, para corroborar si las presiones máximas de Biogás siguieron una distribución normal. De acuerdo con la distribución que presentaron los datos, se observó que estos se ajustaron adecuadamente a línea recta (de color azul) que se muestra en la figura, indicando al parecer que sí tuvieron una distribución normal. Por otra parte, se tiene que el *p-valor* (0,313) que se obtuvo con la prueba de normalidad resultó ser mayor que el nivel de significancia previamente establecido (0,05). Indicando que no hubo rechazo de la hipótesis nula, y que los datos de verdad siguieron una distribución normal.

Estos resultados son muy importantes porque validan todas las pruebas realizadas anteriormente, ya que uno de los criterios de la estadística paramétrica, establece que para cumplir con determinados parámetros estadísticos como la media y desviación típica, es necesario que los datos cumplan con el supuesto de normalidad.

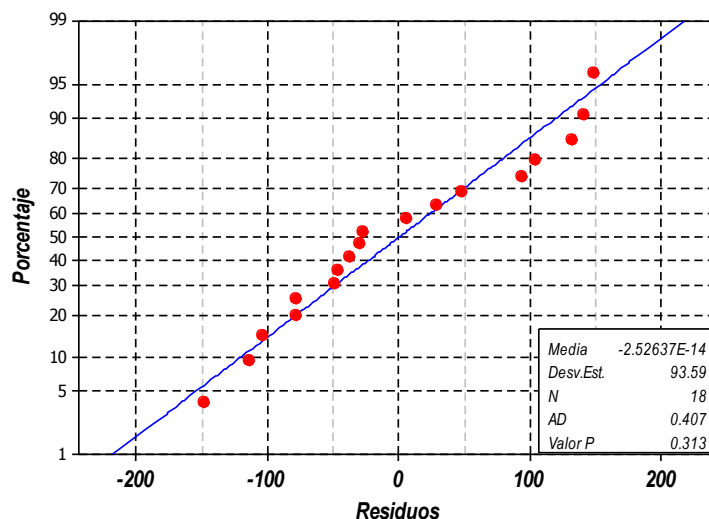


Figura 4.10. Prueba de normalidad de residuos de Presiones Máximas de Biogás

• POST ANOVA

Teniendo en cuenta que el factor pH inicial, fue el único que tuvo una influencia significativa sobre la variable de respuesta, se aplicó un análisis de varianza por grupo (POST ANOVA) para identificar si habían diferencias entre los niveles de pH inicial (5.0, 5.4 y 5.7 unidades).

Para lograr esto, se empleó el programa estadístico Minitab v.16 y se agrupó la información utilizando el método de Tukey con una confianza del 95%. La Tabla 4.4 muestra los resultados obtenidos de la prueba POST ANOVA aplicada al factor pH inicial.

Tabla 4.4. POST ANOVA para el factor pH inicial

| pH inicial | N | Media | Agrupación |
|------------|---|-------|------------|
| 5,0 | 6 | 952,8 | A |
| 5,4 | 6 | 914,7 | A |
| 5,7 | 6 | 710,7 | B |

De acuerdo con los resultados que se presentan en la Tabla 4.4, se puede decir que las medias de los niveles del factor pH inicial 5.0 y 5.4 unidades no son significativamente diferentes, mientras que la media del nivel de pH inicial 5,7 unidades es todo lo contrario. Ya que uno de los criterios estadísticos para este tipo de prueba, indica que las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Con base en los resultados obtenidos a través de las distintas pruebas estadísticas (ANOVA y POST ANOVA principalmente), se logró deducir que en el proceso de fermentación oscura del agua residual agroindustrial, las presiones máximas de biogás (variable de respuesta) se vieron afectadas únicamente por el factor pH inicial y no por la interacción con el factor Tipo de pre-tratamiento. Y a su vez, que el proceso puede ser operado a pH inicial de 5.0 ó 5.4 unidades, ya que se logró comprobar por medio de la estadística, que no existían diferencias significativas entre las presiones máximas de Biogás que se alcanzaron en tales condiciones.

4.3.EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE BIOGÁS EN REACTORES ACIDOGÉNICOS

De acuerdo con Wang et al. (2006) la determinación de la composición del biogás generado en procesos de fermentación oscura, es importante porque de esta manera logra conocerse no solo la cantidad de H_2 que los microorganismos generaron a partir de un sustrato líquido o sólido, sino también predecir (de ser necesario) la tecnología de tratamiento más apropiada, que permita aumentar la concentración de H_2 en el biogás. Ya que no siempre, la mezcla de gases que componen el biogás es cien por ciento H_2 , sino que también, pueden coexistir otros tipos de gases (CO_2 y CH_4) que *a posteriori* podrían representar obstáculos para el aprovechamiento del H_2 como vector energético.

En este sentido, se muestra la Tabla 4.5 para reconocer cuál fue la composición del biogás durante el proceso de fermentación oscura.

Tabla 4.5. Composición del biogás en RA evaluados según el tipo de pre-tratamiento y pH inicial

| Tipo de Pre-tratamiento | pH inicial Unidades | Reactor No. | Tiempo de muestreo (hora) | Composición de Biogás (% en volumen) | | | |
|-------------------------|---------------------|-------------|---------------------------|--------------------------------------|--------|--------|-------|
| | | | | H_2 | CH_4 | CO_2 | N_2 |
| Químico | 5,7 | 2 | 42 | 5,54 | 0,13 | 31,16 | 63,17 |
| | | | 93 | 1,12 | 4,04 | 35,71 | 59,13 |
| | | | 142 | 0,00 | 4,13 | 29,66 | 66,21 |
| | | | 214 | 0,00 | 4,84 | 39,41 | 55,75 |
| | 5,4 | 5 | 42 | 11,20 | 0,00 | 30,42 | 58,38 |
| | | | 93 | 11,60 | 1,36 | 35,05 | 51,99 |
| | | | 142 | 2,76 | 4,72 | 36,91 | 55,61 |
| | | | 214 | 0,23 | 5,36 | 39,70 | 54,70 |
| | 5,0 | 9 | 42 | 8,16 | 0,00 | 28,46 | 63,38 |
| | | | 93 | 11,60 | 1,03 | 33,29 | 54,08 |
| | | | 142 | 0,86 | 3,05 | 34,60 | 61,49 |
| | | | 214 | 0,00 | 3,48 | 40,33 | 56,19 |
| Térmico | 5,7 | 12 | 42 | 9,49 | 0,14 | 30,45 | 59,92 |
| | | | 93 | 3,87 | 3,18 | 35,31 | 57,64 |
| | | | 142 | 0,47 | 4,43 | 28,18 | 66,93 |
| | | | 214 | 0,00 | 14,24 | 36,23 | 49,53 |
| | 5,4 | 15 | 42 | 0,06 | 0,06 | 27,66 | 72,22 |
| | | | 93 | 9,71 | 1,56 | 33,91 | 54,82 |
| | | | 142 | 1,08 | 4,80 | 30,30 | 63,82 |
| | | | 214 | 0,00 | 7,17 | 39,59 | 53,24 |
| | 5,0 | 18 | 42 | 2,78 | 0,00 | 26,94 | 70,28 |
| | | | 93 | 13,23 | 1,06 | 33,25 | 52,45 |
| | | | 142 | 0,29 | 3,78 | 34,30 | 61,63 |
| | | | 214 | 0,16 | 4,89 | 39,26 | 55,70 |

Con relación a la información que se muestra en la Tabla 4.5, se encontró que el biogás producido estuvo compuesto principalmente de N_2 y CO_2 en concentraciones superiores al 50 y 30 % respectivamente, mientras que las concentraciones H_2 y CH_4 en el biogás fueron inferiores al 20%. Lo anterior no es el comportamiento esperado, puesto que al trabajar con un sustrato (agua residual agroindustrial) rico en carbohidratos y fácilmente asimilable por los microorganismos, se esperaba que en el biogás la concentración de H_2 fuera mayor a la del CH_4 principalmente.

N_2 . En cuanto a la presencia de N_2 en el biogás, se descarta el hecho de que durante la fermentación oscura del agua residual agroindustrial, se hubiesen llevado a cabo procesos de desnitrificación que expliquen la alta concentración de N_2 , básicamente porque el principal proceso que ocurrió en el experimento fue la acidogenesis, siendo muy poco probable que la cantidad de nitrógeno total amoniacal (19 mg $N.NH_3.L^{-1}$) que tenía inicialmente el agua residual fuera transformada a N_2 gaseoso (Orozco y Salazar, 1985; Mihelcic, 2001; Romero, 2004). Sin embargo, lo que posiblemente pudo haber ocurrido, obedece al hecho de que antes de iniciar con el experimento, no se purgaron los reactores con un gas

inerte (por ejemplo Argón) para expulsar los diferentes gases atmosféricos (N_2 , CO_2 , O_2) que pudieron haber quedado atrapados en el headspace al momento de sellar los reactores (Kraemer y Bagley, 2007; Bedoya et al., 2008).

CO₂. Respecto al CO_2 se puede decir que su presencia en el biogás, fue producto de la reacción que ocurrió entre el bicarbonato de sodio que se adicionó y los AGVs generados durante la fermentación oscura del agua residual agroindustrial. De acuerdo con Brown et al. (2004) y Pérez (2007) cuando el bicarbonato de sodio entra en disolución, se ioniza formando el ion bicarbonato (HCO_3^-) y a su vez, aumenta la capacidad Buffer de la disolución. Sin embargo, cuando la disolución contiene ácidos como los AGVs, los bicarbonatos reaccionan con estos para formar CO_2 gaseoso. Específicamente, en la reacción del HCO_3^- con un ácido se produce primero ácido carbónico (H_2CO_3) y si este está presente en disolución en suficiente concentración, se descompone para formar CO_2 que escapa de la disolución como gas (Mohan et al., 2011; Mohammadi et al., 2012b).

Las relaciones CO_2/H_2 más bajas que se determinaron en el biogás fueron de 3,02 y 2,51 correspondientes a los reactores 5 y 18 respectivamente (ver Tabla 4.5). Lo cual no es lo más recomendable, puesto que teóricamente la relación CO_2/H_2 más baja que se puede obtener es de 0,5. Y de las experiencias que se tienen sobre este tema indican que, el tipo de alcalinizante es una de las variables más influyentes, porque existen productos como el bicarbonato de sodio que al reaccionar con los AGVs aumentan la relación CO_2/H_2 , mientras que otros como el fosfato de sodio generan todo lo contrario. Por ejemplo Chang et al. (2002) y Lee et al. (2004) emplearon bicarbonato de sodio como alcalinizante y obtuvieron relaciones CO_2/H_2 que variaron en el rango (1,6 a 3,0); mientras que Wang et al. (2006), Wang y Chang (2007) y Marques et al. (2009) manejaron fosfato de sodio y alcanzaron relaciones entre (0,74 a 0,80); (0,6 a 1,1); y (0,13 a 0,5) respectivamente.

Conforme a lo mencionado anteriormente, se puede decir que debido a la alta concentración de CO_2 que se encontró en el biogás este debe ser pre-tratado antes de pensar en su aprovechamiento energético, dado que una de las cosas que más se desean en este tipo de procesos es obtener una menor relación CO_2/H_2 , porque de esta manera se refleja que hubo una menor producción de CO_2 en el biogás. Adicionalmente, se tiene que una alta concentración de CO_2 en el Biogás no es muy conveniente ambientalmente porque incentiva la producción y almacenamiento de CO_2 en la atmosfera, y este gas según Valdez et al. (2005); Nie et al. (2007); y Birol (2013) es uno de los responsables de causar el efecto invernadero; y económicamente porque para poder hacer uso del H_2 en aplicaciones económicamente viables (celdas de combustibles), es necesario aumentar primero su concentración en el biogás mediante procedimientos muy complejos y costosos (tecnologías de membranas porosas y no porosas, termo-resistentes y de polímeros etc), que al final podrían atentar contra la aplicación y sostenimiento de procesos de fermentación oscura en pequeñas y medianas industrias dedicadas a la extracción de almidón de yuca (Claassen et al., 1999; Horvath et al., 2004; Kraemer y Bagley, 2007; Bedoya et al., 2008; Bakonyi et al., 2013).

H₂ y CH₄. En la Figura 4.11 y 4.12 se muestran las curvas de concentración respecto al H_2 y CH_4 según la Tabla 4.5.

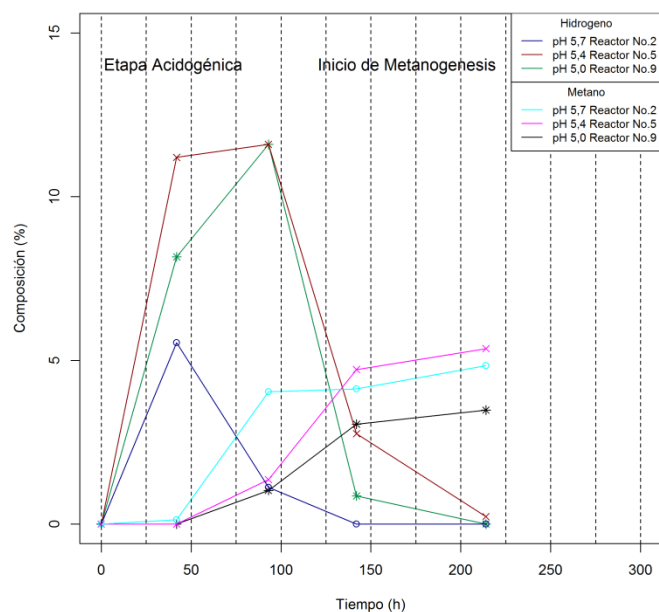


Figura 4.11. Concentración de H_2 y CH_4 en RA evaluados mediante Pre-tratamiento Químico y pH inicial

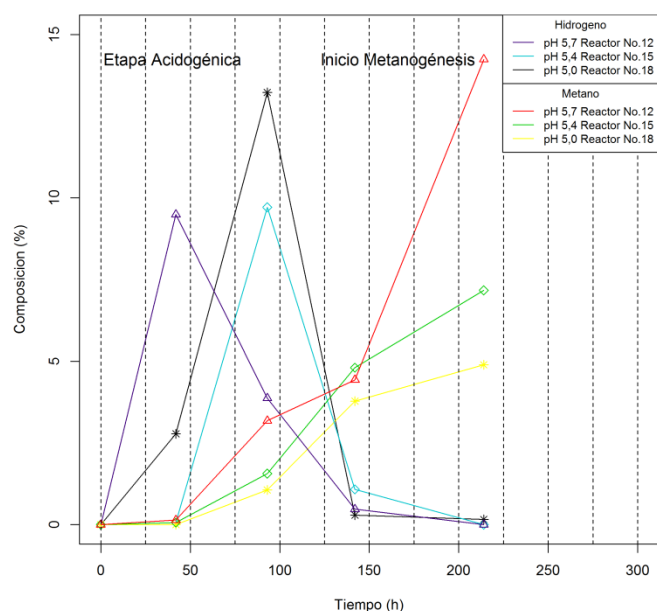


Figura 4.12. Concentración de H_2 y CH_4 en RA evaluados mediante Pre-tratamiento Térmico y pH inicial

De acuerdo con la información que se presenta en la Figura 4.11 y 4.12, se puede decir que en las primeras 100 horas, el proceso estuvo gobernado principalmente por la acidogénesis o fermentación de carbohidratos, debido a que en este tiempo se observó una mayor producción o concentración de H_2 con relación al CH_4 . De acuerdo con Pavlostathis (2011) y Hallenbeck (2013) en esta etapa, las bacterias acidogénicas toman los carbohidratos que se encuentran en el medio en forma soluble (glucosa y sacarosa), y los excretan luego como sustancias orgánicas en forma de AGVs (Ácido acético, butírico, propiónico y láctico entre otros) e H_2 principalmente.

Con base en la información que se muestra en estas figuras, se puede decir también que después de las 100 horas, inicio a una posible etapa metanogénica que simultáneamente disminuyó la concentración de H_2 y aumento la de CH_4 . El tipo de metanogénesis que pudo haber propiciado el consumo de H_2 es la de tipo Hidrogenotrófica, ya que autores como Coates et al. (1996); Aquino y Chernicharo (2005); y Lamaison (2012) indican que existen microorganismos que toman el H_2 y CO_2 como donador y aceptor de electrones (respectivamente) para producir CH_4 .

Entre los factores que probablemente ocasionaron la formación de CH_4 por vía de la Metanogénesis Hidrogenotrófica, se tiene que el pH final del medio pudo haber sido uno de ellos, ya que todos los reactores acidogénicos (ver Figura 4.12), presentaron al final del ensayo experimental valores de pH cercanos a 6,0 unidades. De acuerdo con Torres et al. (2011) un rango de pH entre 6,0 a 8,3 unidades es suficiente, como para que las arqueas metanogénicas consigan la estabilidad que necesitan para llevar a cabo la formación de metano.

4.4. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE H_2 EN REACTORES ACIDOGÉNICOS (RA)

La Tabla 4.6 muestra los resultados correspondientes de los reactores acidogénicos que fueron seleccionados para determinar la producción en términos del rendimiento de H_2 ($\text{mol H}_2 \cdot \text{mol Glucosa}^{-1}$).

Tabla 4.6. Producción de H_2 en Reactores Acidogénicos

| Tipo de Pre-tratamiento | Reactor No. | pH (Unidades) | Rendimiento ($\text{mol H}_2 \cdot \text{mol Glucosa}^{-1}$) |
|-------------------------|-------------|---------------|----------------------------------------------------------------|
| | | Inicial | |
| Químico | 2 | 5,69 | 0,198 |
| | 5 | 5,39 | 1,100 |
| | 9 | 5,00 | 0,958 |
| Térmico | 12 | 5,70 | 0,581 |
| | 15 | 5,40 | 0,728 |
| | 18 | 5,00 | 1,245 |

De acuerdo con la información que se muestra en la Tabla 4.6, se puede decir que la condición experimental (tipo de pre-tratamiento y pH inicial) que reflejó una mayor producción de H_2 corresponde al pre-tratamiento térmico a pH inicial de 5,0 unidades (Reactor 18), seguido del pre-tratamiento químico a pH inicial de 5,4 unidades (Reactor 5). Mientras que, las condiciones menos favorables correspondieron al pre-tratamiento químico y térmico a pH inicial de 5,7 unidades (Reactor 2 y 12 respectivamente).

Estos resultados coinciden con lo obtenido previamente a través del seguimiento de las curvas de presión total, donde se concluyó estadísticamente que independientemente del tipo de pre-tratamiento, la máxima producción de H_2 , posiblemente podía encontrarse entre el pH inicial de 5,0 y 5,4 unidades, ya que no se encontraron diferencias significativas entre las presiones máximas, ubicadas en este rango de pH inicial. Por lo que, se puede afirmar que el seguimiento de las curvas de presión total, es una práctica útil que muestra (indirectamente) por medio de las presiones máximas de biogás, la condición experimental con mayor producción de H_2 .

Acorde con esto, se puede indicar que la condición experimental (pre-tratamiento térmico a pH inicial de 5,0 unidades) aplicada al Reactor 18, resultó ser la mejor, porque cumple con varios propósitos (efectividad y economía) que se necesitan para que este tipo de procesos alcance la aceptación que se merece en el sector energético, y así halla una propuesta diferente a la planteada en los métodos tradicionales de producción de energía, para satisfacer la demanda energética del sector transporte, industrial, residencial y agropecuario.

Por otro lado, también se pudo inferir que un pH inicial de 5,7 unidades no es lo más recomendado para llevar a cabo el proceso de fermentación oscura del agua residual agroindustrial, puesto que bajo esta condición, indiscutiblemente las presiones máximas de biogás resultan ser menores a las conseguidas a pH inicial de 5,0 y 5,4 unidades independientemente del tipo de pre-tratamiento que se utilice.

El pre-tratamiento térmico a pH inicial de 5,0 unidades mostró ser efectivo, posiblemente porque fue el que mejor respondió en cuanto a la inhibición de microorganismos consumidores de H_2 y protección de la actividad hidrogenasa. De acuerdo con Kannaiah et al. (2013) el pre-tratamiento térmico le proporciona

una mayor estabilidad al inóculo, frente al recrecimiento o repoblación de microorganismos consumidores de H_2 (arqueas metanogénicas y bacterias homoacetogénicas) cuando las condiciones fisicoquímicas del medio (pH) y estrategia de operación del proceso (tiempo de operación) lo permiten. Por otra parte, según Zheng y Yu (2004); Masset et al. (2010); y Saratale et al. (2013) un pH inicial de 5,0 unidades permite que haya una buena respuesta de la enzima hidrogenasa y una adecuada distribución de metabolitos ácidos (ácido acético y butírico) asociados a una mayor producción de H_2 .

Acercas de las ventajas que presenta el pre-tratamiento térmico, cabe indicar que disminuye el costo económico en el sentido de que le proporciona al inóculo por más tiempo, estabilidad frente al restablecimiento de bacterias homoacetogénicas y arqueas metanogénicas cuando se tienen procesos que han pasado por tiempo de operación muy largos. De modo que el número de veces que se vuelve a pre-tratar el inóculo para garantizar su condición inicial es menor, haciéndolo más atractivo económicamente.

Por ejemplo, en el estudio realizado por Kannaiah et al. (2013) se observó que al operar un reactor anaerobio (AnSBR) durante mucho tiempo (260 ciclos-96 horas.ciclo⁻¹), solo era necesario pre-pretratar el inóculo una sola vez (ciclo 86), ya que era lo suficiente para evitar un re-crecimiento de organismos no formadores de esporas como las arqueas metanogénicas. Otro aspecto que hace viable la aplicación de este tipo de pre-tratamientos, es que es simple, de menor costo y rápido si se compara con el pre-tratamiento químico. De acuerdo con Kim y Shin (2008) para el pre-tratamiento térmico solo se necesita un tiempo de exposición que varía entre 15 y 180 min (dependiendo de la temperatura), mientras que para el pre-tratamiento ácido se requiere de por lo menos un día.

Y en cuanto al costo económico relacionado con la cantidad de bicarbonato de sodio, necesaria para ajustar el pH (3,72 unidades) del agua residual agroindustrial a 5.0 y 5.4 unidades, se podría decir el pH de ajuste más favorable es 5,0 unidades, porque de esta manera se consumiría menos bicarbonato de sodio y se reduciría el costo económico. Claro que este tipo de decisiones conviene estudiarlas muy bien, porque no siempre las características fisicoquímicas del agua residual agroindustrial son las mismas, de hecho Torres et al. (2006) y Pérez (2007) indican que la variabilidad en la composición y concentración del agua residual está ligada a factores como la variedad de la yuca, la edad de la planta, el tiempo de almacenamiento de las raíces y tecnología empleada para la extracción, entre otros.

Teniendo en cuenta que con el Reactor 18 se consiguió un rendimiento de $1,24 \text{ mol } H_2.\text{mol Glucosa}^{-1}$, es preciso reconocer frente a la literatura, que este valor es similar al rendimiento conseguido por Chen et al. (2008) ($1,23 \text{ mol } H_2.\text{mol glucosa}^{-1}$) y Cappelletti et al. (2011) ($1,20 \text{ mol } H_2.\text{mol glucosa}^{-1}$), a pesar de que el sustrato empleado en este estudio (agua residual agroindustrial) difiera en algunas características (pureza y concentración) que los sustratos empleados por estos autores.

De manera análoga cuando se hace la comparación con sustratos reales y en especial con un agua residual (agroindustrial) de procedencia similar a la de este estudio, se tiene que el rendimiento de H_2 es mayor al obtenido, por ejemplo Cakır et al. (2010) consiguieron un rendimiento de $2,40 \text{ mol } H_2.\text{mol glucosa}^{-1}$; Cappelletti (2012) de $2,41 \text{ mol } H_2.\text{mol glucosa}^{-1}$, y Lamaison (2012) de $1,82 \text{ mol } H_2.\text{mol glucosa}^{-1}$.

A pesar de que el rendimiento obtenido experimentalmente, resultó ser aproximadamente dos (2) veces más bajo que los reportados por Cakır et al. (2010), Cappelletti (2012) y Lamaison (2012), no se deben perder las expectativas en cuanto a la potencialidad de reuso energético de este residuo para la producción de H_2 .

Al comparar la concentración de carbohidratos en el agua residual agroindustrial que fue de $491 \text{ mg glucosa. L}^{-1}$ con lo reportado en la literatura se tiene que es bajo, puesto que autores como Cappelletti (2012) reportan concentraciones de $1.230 \text{ mg glucosa.L}^{-1}$ con rendimientos de H_2 iguales a $2,41 \text{ mol } H_2.\text{mol glucosa}^{-1}$. Lo que demuestra, que probablemente la baja concentración de carbohidratos pudo haber influido en la baja producción de H_2 , puesto que si a los microorganismos no se les proporciona la suficiente cantidad de alimento, como para poner a funcionar su "maquinaria" metabólica, difícilmente las rutas metabólicas (ácido acético y butírico) tendrán una mayor producción de H_2 .

Un aspecto que es muy importante dejar en claro, es que la baja concentración de carbohidratos puede ser atribuida al efecto de variables ambientales (temperatura ambiente y humedad) que motivaron durante la sedimentación del agua residual, la actividad de bacterias ácido lácticas. Porque de acuerdo con Aristizábal y Sánchez (2007); Kim et al. (2008) y Saratale et al. (2013) los carbohidratos que comúnmente se encuentran en productos alimenticios como la yuca, papa y maíz, durante su almacenamiento pueden ser convertidos en varios ácidos (ácido acético y láctico principalmente), lo que resulta en una reducción de su potencial para la producción de H_2 . Estos autores señalan también, que la problemática de la producción de H_2 a partir de residuos de alimentos, es debida principalmente a la presencia de una microflora endógena productora de ácido láctico, que se ve favorecida enzimáticamente cuando la temperatura del medio se encuentra por arriba de los 2 °C

Casos muy puntuales, como los de Fernandes Jr (1995); Noike et al. (2002) y Reginatto et al. (2011) muestran claramente, que la presencia en el mismo medio de bacterias ácido lácticas y acidogénicas, puede conducir a una completa inhibición de la producción de H_2 . Según Noike et al. (2002) esto sucede porque las bacterias ácido lácticas como la *Lactobacillus paracasei* y *Enterococcus durans* excretan ciertos antibióticos o bacteriocinas que inhiben el crecimiento de bacterias productoras de H_2 como los *Clostridium*. Por fortuna, existen algunos pre-tratamientos que se le aplican a los residuos empleados como sustratos para inactivar el crecimiento de bacterias lácticas, entre los cuales se encuentran el pre-tratamiento térmico a 55 °C (Chen et al., 2008), la aplicación de tripsina (Noike et al., 2002) y pre-tratamientos ácidos (HCL) o alcalinos (NaOH) en concentraciones que varían entre 0,5 a 2 % (Kim et al., 2011b).

4.5. EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES FÍSICOQUÍMICAS

En la Tabla 4.7 se muestran los valores medios de los parámetros físicoquímicos (pH, Alcalinidad Total y Bicarbonática, DQO_{Total} y AGVs) medidos al sobrenadante de los reactores acidogénicos alimentados con agua residual agroindustrial. En el Anexo 3 se muestra la caracterización físicoquímica completa del sobrenadante de todos los reactores acidogénicos (incluye blancos).

Tabla 4.7. Caracterización físicoquímica del sobrenadante en Reactores Acidogénicos

| Tipo de Pre-tratamiento | Reactor No. | pH (Unidades) | | Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L ⁻¹) | | | | DQO ^{Total} ^a (mg.L ⁻¹) | AGVs ^b (mg.L ⁻¹) | Reducción ^c Carbohidratos (%) |
|-------------------------|-------------|---------------|-------|------------------------------------------------------|-------|---------|-------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|
| | | | | Bicarbonatica | | Total | | | | |
| | | Inici al | Final | Inicial | Final | Inicial | Final | Final | Final | |
| Químico | 1, 2 y 3 | 5,70 | 6,04 | 514 | 355 | 886 | 974 | 2.652 | 1616 | 95,3 |
| | 4, 5 y 6 | 5,40 | 5,93 | 409 | 278 | 729 | 873 | 2.849 | 1580 | 94,7 |
| | 7, 8 y 9 | 5,00 | 5,76 | 203 | 173 | 423 | 732 | 2.755 | 1668 | 95 |
| Térmico | 10, 11 y 12 | 5,70 | 6,08 | 542 | 405 | 929 | 991 | 2.449 | 1596 | 93,7 |
| | 13, 14 y 15 | 5,40 | 6,02 | 395 | 345 | 685 | 910 | 2.697 | 1578 | 93,7 |
| | 16, 17 y 18 | 5,00 | 5,85 | 193 | 230 | 406 | 773 | 2.772 | 1636 | 94,3 |

a) DQO_{Total} Inicial: 2.671 mg.L⁻¹

b) AGVs Inicial: 2.042 mg Ac. acético.L⁻¹

c) Carbohidratos Inicial: 491 mg glucosa.L⁻¹

4.5.1. Carbohidratos

En la Figura 4.13 se muestra la reducción de carbohidratos (%) alcanzada por los RA durante la producción de H_2 . En cuanto a este parámetro fisicoquímico se puede decir que todos los reactores acidogénicos respondieron como se esperaba, es decir que presentaran una reducción adecuada de la cantidad de carbohidratos que tenía inicialmente el agua residual agroindustrial. En este sentido, se tiene que los porcentajes de reducción (>90%) fueron adecuados porque resultaron ser similares o mayores (85 y 60 %) a los reportados por Cakir et al. (2010) y Cappelletti et al. (2011) respectivamente.

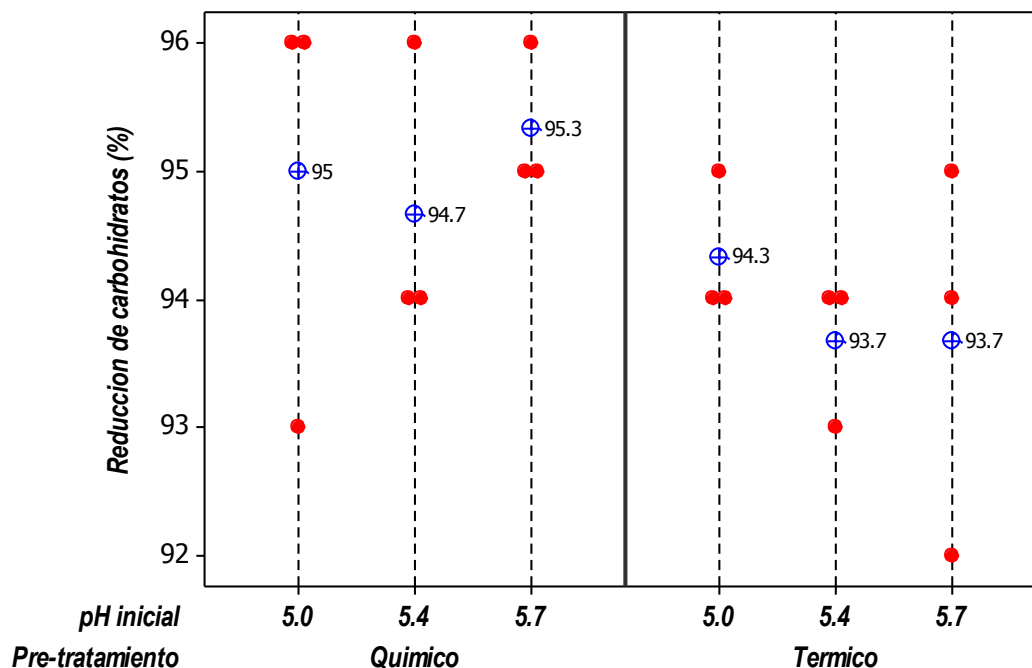


Figura 4.13. Reducción de carbohidratos (%) en Reactores Acidogénicos

Al parecer, todos los reactores de la Figura 4.13 presentaron la misma eficiencia de reducción de carbohidratos, incluso hubo algunos (por ejemplo el Reactor No.2 – pH inicial 5,7 unidades) que experimentaron un mayor porcentaje de reducción (95,3%) pero con bajo rendimiento de H_2 ($0,198 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol glucosa}^{-1}$). Lo que muestra que no siempre un mayor consumo de carbohidratos necesariamente produce mayor cantidad de H_2 , cómo lo expuesto por Lee et al. (2008) y Chang et al. (2011) quienes mencionan que todo depende de la ruta metabólica (ácido acético, butírico, propiónico y etanol) que se quiera favorecer mediante el pre-tratamiento del inoculo y ajustando el pH del medio donde reposarán todas las actividades microbianas al consumir el sustrato.

4.5.2. pH, Alcalinidad Bicarbonática y AGVs

En procesos de fermentación oscura, el pH es una variable muy importante porque es una de las responsables de controlar la actividad de la enzima hidrogenasa y de direccionar las diferentes rutas metabólicas (Ácido acético y butírico) de los microorganismos hacia la producción H_2 . Para varios autores (Khanal et al., 2004; Kawagoshi et al., 2005; Bao et al., 2012) lo que debería de ocurrir con el pH una vez ajustado a un valor fijo (inicial), es que este disminuya conforme los microorganismos se alimentan del sustrato y producen simultáneamente ácidos grasos volátiles (AGVs) e H_2 .

En la Figura 4.14 se muestran los valores de pH inicial y final del sobrenadante de los reactores acidogénicos, que al compararlos, se observó que no se cumple con lo mencionado en la literatura, es decir que no hubo disminución del pH inicial en la medida en que el agua residual agroindustrial era aprovechada por los microorganismos para producir H_2 .

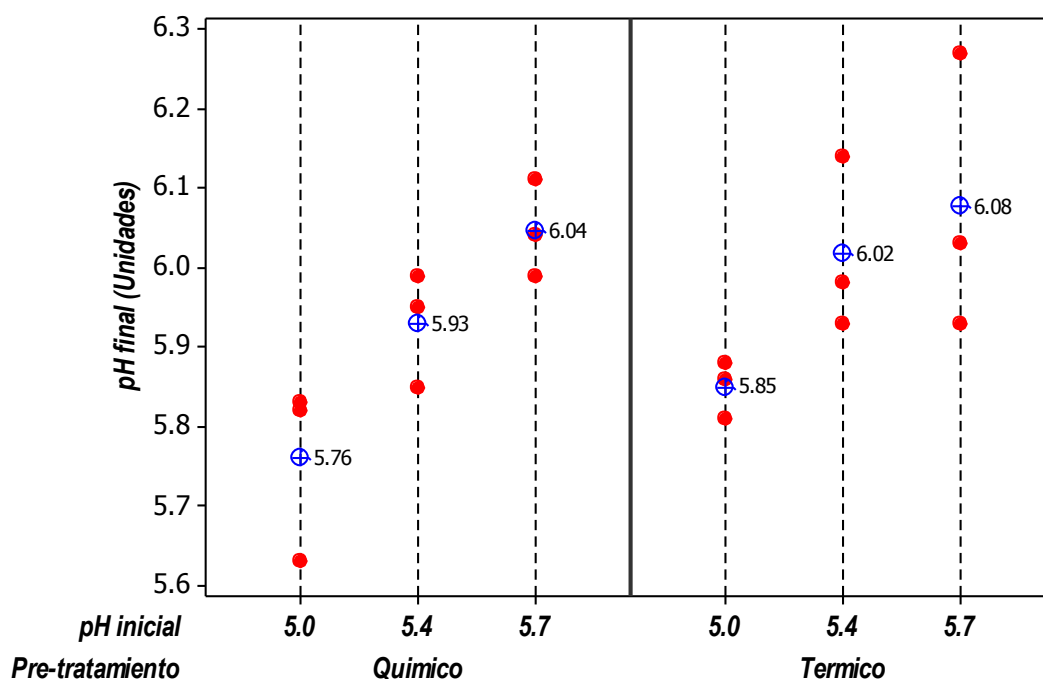


Figura 4.14. pHs iniciales y finales en Reactores Acidogénicos

Existen casos, en donde al emplear un tipo de agua residual similar a la del estudio, cómo fuente de carbono para los microorganismos, el pH final alcanza valores entre 4,0 y 5,0 unidades (Cappelletti et al., 2011; O-Thong et al., 2011; Leañó y Babel, 2012). Probablemente una de las razones que explican estas diferencias, se refiere al tipo de alcalinizante empleado, ya que comúnmente se utilizan tres tipos de alcalinizantes (NaOH , NaHCO_3 y Na_2HPO_4) que al generar capacidad Buffer tratan de impedir la caída del pH del medio.

En este estudio el alcalinizante empleado fue el NaHCO_3 y teniendo en cuenta lo anterior, se puede decir que el bicarbonato de sodio si logró ejercer un poder tampón que impidió que el pH final del medio, cayera por debajo del pH inicial, al que fueron ajustados todos los reactores al inicio del experimento. Este hecho es consistente con los resultados de Lin et al. (2008) en donde al finalizar su estudio, encontraron que una de las razones por las cuales el pH final (5,5 unidades) del medio se mantuvo por encima del pH inicial (5,0 unidades), era debido a que durante el experimento no se controlaron muy bien las concentraciones de carbonatos (NaHCO_3 y NH_4HCO_3) y fosfatos (K_2HPO_4) que se adicionaron, ya sea como macronutrientes o Buffers. Por otra parte, Lamaison et al. (2014) también encontraron un comportamiento similar, el pH final (7,2 unidades) del medio se mantuvo por encima del pH inicial (7,0 unidades), posiblemente porque la concentración de alcalinizante fue muy alta ($1.465 \text{ mg NaHCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$).

De acuerdo con Chernicharo (2007) no todos los alcalinizantes proporcionan alcalinidad bicarbonatada de la misma forma, por ejemplo el NaOH solo proporciona alcalinidad cuando reacciona con el gas carbónico, mientras que el NaHCO_3 y Na_2HPO_4 lo hacen directamente. Probablemente, esta sea una de las premisas más importantes que generan diferencias en cuanto a los valores de pH final logrados en distintos estudios. Por ejemplo Luo et al. (2010a) al trabajar con un sustrato (agua residual de yuca) de características similares al de este estudio, lograron probar que el NaHCO_3 proporciona una mejor capacidad Buffer que el NaOH , y que de cierta manera, esto aumenta el rendimiento de H_2 hasta en un 30 %, principalmente porque evita que el pH final del medio llegue a valores ($< 4,5$ unidades) que afectan la actividad de la enzima hidrogenasa. De hecho, una de las conclusiones más importantes formulada por Torres et al. (2011) habla sobre la potencialidad del uso de bicarbonato de sodio tanto para neutralizar la acidez como para garantizar capacidad buffer durante el tratamiento anaerobio, a diferencia del hidróxido de sodio, el cual aunque resulta un poco más económico, puede llegar a disminuir la presión de CO_2 (generación de vacío) en el sistema de tratamiento y riesgos por sobredosificación y manipulación.

En la Figura 4.15 se muestran los valores de alcalinidad Bicarbonatica que se midieron al inicio y final del experimento.

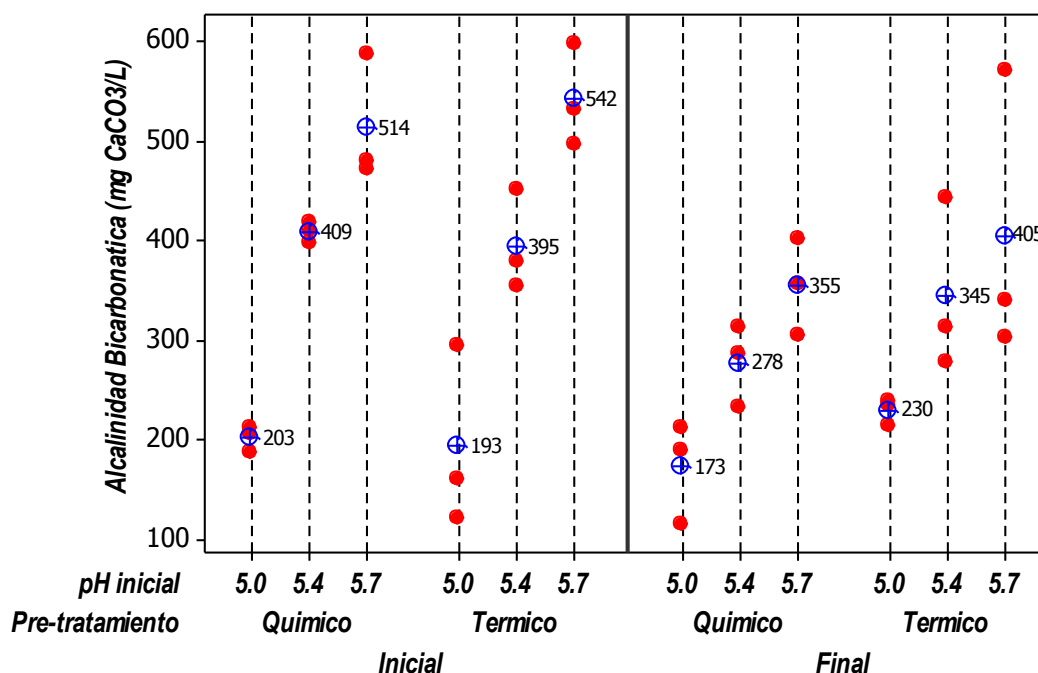


Figura 4.15. Alcalinidad Bicarbonatica en Reactores Acidogénicos

Estos valores indican un consumo y por tanto se corrobora lo mencionado por Lin y Lay (2004), Wang et al. (2006) y Davila et al. (2011) quienes mencionan que la perdida de alcalinidad ocurre porque durante la fermentación oscura, los bicarbonatos reaccionan con los AGVs que se generan, cuando los microorganismos simultáneamente producen H₂ (Davila et al., 2011). Este hecho, también ha sido observado por Khanal (2009b) en donde menciona, qué cuando los AGVs empiezan a acumularse en un reactor anaerobio, inmediatamente son neutralizados por la alcalinidad presente en el reactor, con lo que el pH del medio tiende a mantenerse en un nivel estable, mientras que la concentración de bicarbonatos desciende. Particularmente, Devi et al. (2010) observaron este fenómeno, correlacionando la variación del pH (7, 6 y 5,0 unidades) con el correspondiente perfil de alcalinidad (900, 600 y 150 mg CaCO₃.L⁻¹ respectivamente) en reactores en Batch durante un periodo de operación de 120 horas; encontrando en todos los casos, que efectivamente la alta producción de AGVs a pH de 7,0 unidades (1.079 mg .L⁻¹), 6,0 unidades (1.302 mg.L⁻¹), y 5,0 unidades (985 mg Ac.acetico.L⁻¹) inducia el descenso de la alcalinidad (380±60 mg CaCO₃.L⁻¹) al final del proceso.

Respecto a los AGVs finales (ver Figura 4.16) es muy importante indicar que por la forma (Batch) como se operaron los reactores no permite establecer una relación con los rendimientos de H₂ alcanzados, principalmente porque esta variable fisicoquímica (AGVs) no se midió de forma continua, o al mismo tiempo en que se tomaron las muestra de biogás para cuantificar el H₂ producido. De modo que, no sería representativo para los intereses de este estudio, decir que el rendimiento de H₂ observado en cada uno de los reactores, fue producto de la concentración de los AGVs que se determinaron al final del experimento.

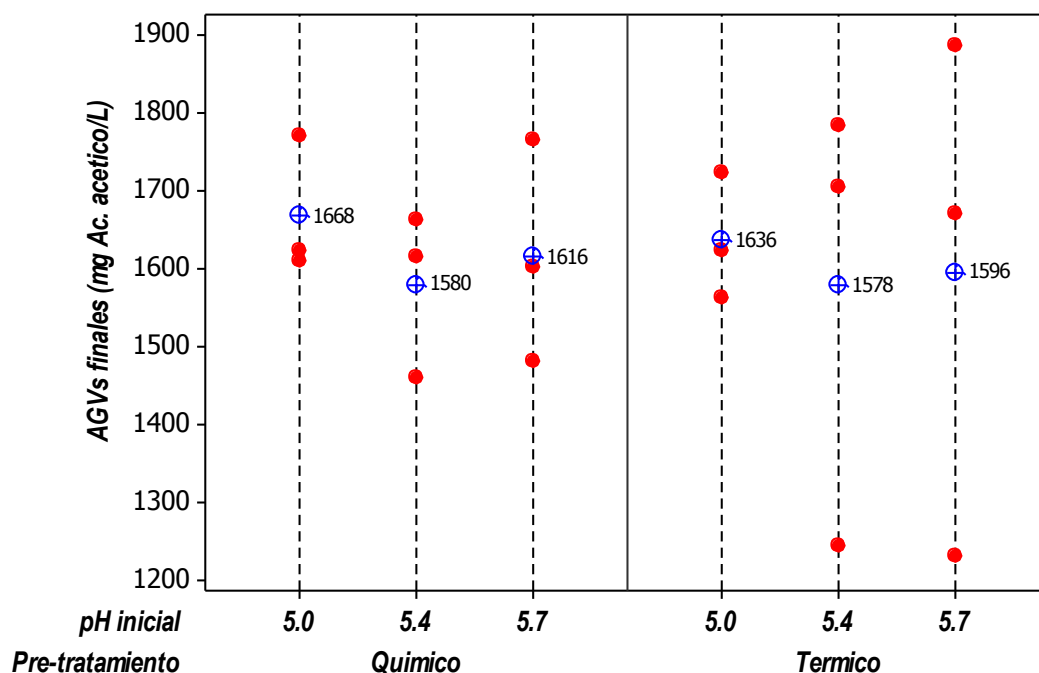


Figura 4.16. Ácidos Grasos Volátiles Finales en Reactores Acidogénicos

Tampoco es conveniente que la concentración de AGVs finales, sea motivo de análisis para identificar si hubo o no inhibición de los microorganismos, por la presencia de estos ácidos en el medio, qué hubiesen podido afectar fuertemente el proceso. Debido a que al final del experimento, los AGVs se encontraban en su forma disociada (pH final > 4,7 unidades), y de acuerdo con Ginkel et al. (2001); y Nath et al. (2006) la única manera en la que los AGVs pueden inhibir los microorganismos, es que se encuentren en su forma no disociada (pH final < 4,7 unidades), porque así podrían penetrar la pared celular de los microorganismos, y disminuir tanto la concentración de ATP intracelular como el consumo de glucosa, lo que resultaría en una baja producción de H_2 .

Sin embargo, lo que sí se puede mencionar con respecto al comportamiento de los AGVs al inicio ($2.042 \text{ mg Ac. Acético.L}^{-1}$) y final del proceso, es que posiblemente los AGVs disminuyeron porque se formaron sales de AGVs (Rozzi, 1986) que a su vez aumentaron la alcalinidad total en cada uno de los reactores acidogénicos.

5. CONCLUSIONES

Respecto a la influencia del pH inicial sobre la producción de H_2 a partir de un inóculo pre-tratado y alimentado con un agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, se puede decir que si influyo en el proceso de fermentación oscura porque al fijar el pH del medio en el rango de 5,0 a 5,4 unidades se logró optimizar el rendimiento de H_2 .

Las dos metodologías de pre-tratamiento (Químico y Térmico) que se emplearon, fueron útiles para inhibir el crecimiento de arqueas metanogénicas en periodos relativamente cortos (<100 horas), pero no marcaron una influencia significativa sobre la producción de H_2 .

Los valores de pH inicial que influyeron significativamente sobre la producción de H_2 fueron 5,0 y 5,4 unidades, debido posiblemente a que se favoreció la actividad de la enzima hidrogenasa y rutas metabólicas implicadas en la producción de H_2 . Mientras que el pH inicial de 5,7 unidades no fue tan conveniente para el proceso, ya que a lo mejor se favorecieron otras rutas metabólicas que no necesariamente están ligadas con la producción de H_2 .

Sin importar el tipo de pre-tratamiento (químico y térmico) del inóculo, es deseable que el pH del medio se conserve entre 5,0 y 5,4 unidades, porque bajo este rango los microorganismos lograron transformar eficientemente el agua residual agroindustrial en H_2 y garantizaron una producción máxima entre 1,245 y 1,100 mol H_2 . mol Glucosa⁻¹ respectivamente.

El rango de temperatura ambiente (29 a 34,5 °C) en el que se desarrolló el experimento, fue el idóneo para que los microorganismos asimilaran el agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca (reducción de carbohidratos > 94%) y produjeran cantidades significativas de H_2 (1,245 y 1,100 mol. mol Glucosa⁻¹).

6. RECOMENDACIONES

Para futuros trabajos de investigación, relacionados con la producción de H_2 a través de procesos de fermentación oscura se deberían considerar las siguientes recomendaciones:

Para ensayos experimentales en Batch en donde se pretenda llevar a cabo procesos de fermentación oscura para producir H_2 , se recomienda emplear otro tipo de alcalinizante (diferente al $NaHCO_3$) para ajustar el pH del agua residual agroindustrial, con la intención de disminuir la producción de CO_2 que se almacena en el headspace de los reactores, y aumentar así la concentración de H_2 en el Biogás.

Dada la utilidad de seguir indirectamente la producción de biogás a través de la presión acumulada, se recomienda utilizar perlas de NaOH, suspendidas en el headspace, con el fin de atrapar el CO_2 que se almacena en el headspace de los reactores acidogénicos y de esta manera asociar de manera anticipada, la presión con la producción de hidrógeno. Además, con esta medida posiblemente se logre aumentar la concentración de H_2 al disminuir la concentración de CO_2 en el Biogás.

Teniendo en cuenta que la agitación es un factor importante que facilita el contacto entre microorganismos y sustrato (agua residual agroindustrial), se recomienda evaluar el efecto de distintas velocidades de mezcla sobre la producción de H_2 . Con el objetivo de establecer un valor óptimo en el que no solo se favorezca el contacto entre microorganismo y sustrato, sino también, en el que se evite (al máximo) tanto la disolución de H_2 en la fase líquida, como la destrucción de gránulos anaerobios formados durante el proceso de aclimatación.

Se recomienda incluir dentro de la caracterización fisicoquímica del sobrenadante, la medición de Ácido acético, butírico, propiónico, láctico y etanol. Ya que de esta manera se puede llegar a conocer realmente, el efecto de ciertas variables fisicoquímicas (pH, alcalinidad y temperatura entre otros) sobre el tipo de vía metabólica que siguen los microorganismos para producir o consumir H_2 .

Se recomienda realizar estudios que evalúen a lo largo de todo el proceso de fermentación oscura, la estabilidad de un inóculo pre tratado (química y térmicamente) para producir H_2 . De tal forma que determine la estabilidad del pretratamiento cuando ciertas variables fisicoquímicas y operacionales se tornen desfavorables, tales como sobrecargas orgánicas o variaciones en el pH entre otras.

Se recomienda que los ensayos experimentales que se hagan en adelante, tengan un cuidado especial en la forma como se adquiere, almacena y procesa la yuca para producir el agua residual agroindustrial, ya que en la post-cosecha inevitablemente la yuca se ve espuesta a condiciones (daños mecánicos, diferencias varietales, condiciones edafoclimáticas y poda de la parte aérea de la planta) que facilitan su deterioro fisiológico y microbiano (Aristizábal y Sánchez, 2007), los cuales terminan por afectar o generar “ruidos” en la fermentación oscura del agua residual agroindustrial para producir H_2 .

Las presiones máximas de biogás pueden ser consideradas como indicadores indirectos de la producción de H_2 , siempre y cuando se garanticen condiciones operacionales (aclimatación y pre-tratamiento del inóculo, y pH inicial del medio) que desmotiven el re-establecimiento de microorganismos consumidores de H_2 (Arqueas metanogénicas hidrogenotróficas).

BIBLIOGRAFIA

- ALARCÓN, F. y DUFOUR, D. 1998. Almidón agro de yuca en Colombia. *Cali Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical*.
- ANGENENT, L., KARIM, K., DAHHAN, M., WRENN, B. y DOMÍGUEZ, R. 2004a. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends in Biotechnology*, 22, 477-485.
- ANGENENT, L., KARIM, K., DAHHAN, M., WRENN, B. y DOMÍGUEZ, R. 2004b. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends in Biotechnology*, 22, 477-485.
- APHA 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.
- AQUINO, S. y CHERNICHARO, C. 2005. Acúmulo de ácidos graxos volátiles (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle.
- AQUINO, S., CHERNICHARO, C., FORESTI, E., SANTOS, M. y MONTEGGIA, L. 2007. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. *Eng. sanit. ambient*, 12, 192-201.
- ARIAS, E. y RODRÍGUEZ, C. 2013. Estudio de la producción de hidrógeno en régimen batch con agua residual proveniente de la industria cervecera.
- ARISTIZÁBAL, J. y SÁNCHEZ, T. 2007. Guía técnica para la producción y análisis de almidón de yuca., Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-a1028s.pdf>. 61-108.
- ARROYAVE, G. 1996. *Factibilidad de depuración de aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca utilizando un sistema de digestión anaerobia de fases separadas.*, Universidad del Valle.
- AZBAR, N., ÇETINKAYA, F., KESKIN, T., KORKMAZ, K. y SYED, H. 2009. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7441-7447.
- BAKONYI, P., NEMESTÓTHY, N. y BÉLAFI-BAKÓ, K. 2013. Biohydrogen purification by membranes: an overview on the operational conditions affecting the performance of non-porous, polymeric and ionic liquid based gas separation membranes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 9673-9687.
- BALACHANDAR, G., KHANNA, N. y DAS, D. 2013. Chapter 6 - Biohydrogen Production from Organic Wastes by Dark Fermentation. In: LARROCHE, A. P.-S. C. C. H. (ed.) *Biohydrogen*. Amsterdam: Elsevier.
- BALAT, H. y KIRTAY, E. 2010. Hydrogen from biomass – Present scenario and future prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 7416-7426.
- BAO, M., SU, H. y TAN, T. 2012. Biohydrogen Production by Dark Fermentation of Starch Using Mixed Bacterial Cultures of *Bacillus sp* and *Brevumdimonas sp*. *Energy & Fuels*, 26, 5872-5878.
- BASTIDAS, J., MOHD, Z., ZENG, R., BERNET, N., PRATT, S., STEYER, J. y BATSTONE, D. 2012. Gas controlled hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, 110, 503-509.
- BÄUMCHEN, C., KNOLL, A., HUSEMANN, B., SELETZKY, J., MAIER, B., DIETRICH, C., AMOABEDINY, G. y BÜCHS, J. 2007. Effect of elevated dissolved carbon dioxide concentrations on growth of *Corynebacterium glutamicum* on d-glucose and l-lactate. *Journal of Biotechnology*, 128, 868-874.

BEDOYA, A., CASTRILLON, J., RAMIREZ, J., VASQUEZ, J. y ZABALA, M. 2008. Producción Biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/article/view/1723/11614>.

BERNAL, J., TINOCO, L., TORRES, L., MALAGÓN, D. y MONTOYA, D. 2013. Evaluating Colombian *Clostridium* spp. strains' hydrogen production using glycerol as substrate. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16.

BIROL, F. 2013. World energy outlook 2013. *International Energy Agency*.

BROWN, T., LEMAY JR, H., BURSTEN, B. y BURDGE, J. 2004. *Química*, Pearson educación, Novena Edición. Disponible en: http://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=jbNCBpVwE9AC&oi=fnd&pg=PR32&dq=quimica+de+brown+novena+edicion&ots=7RFIEeyK1n&sig=6-li7ozbgHAO_7qVFOYqOLak-yo#v=onepage&q=quimica%20de%20brown%20novena%20edicion&f=false

CAJIGAS, A., PERÉZ, A. y TORRES, P. 2005. Importancia del pH y la alcalinidad en el tratamiento anaerobio de las aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca. *Scientia et Technica*, 1.

CAKIR, A., OZMIHCI, S. y KARGI, F. 2010. Comparison of bio-hydrogen production from hydrolyzed wheat starch by mesophilic and thermophilic dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 13214-13218.

CAMPOS, J. 1999. Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. *PROSAB*, 464.

CAPPELLETTI, B. 2012. Efeito da concentração inicial da água residual do processamento da mandioca na produção de biohidrogênio por *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

CAPPELLETTI, B., REGINATTO, V., AMANTE, E. y ANTÔNIO, R. 2011. Fermentative production of hydrogen from cassava processing wastewater by *Clostridium acetobutylicum*. *Renewable Energy*, 36, 3367-3372.

CARMINATO, V. 2013. *Influência do cálcio na produção biológica de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios*. Universidade de São Paulo, Brasil. Disponible en: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-03102013-112833/en.php>.

CARVAJAL, C. 2009. Efecto de la temperatura en la producción de Hidrógeno a partir de las aguas residuales. Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://132.248.52.100:8080/xmlui/handle/132.248.52.100/2942>.

CASTRO, K. 2012. Determinación de los flujos metabólicos en la producción de Hidrógeno.

CHANG, J., LEE, K. y LIN, P. 2002. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1167-1174.

CHANG, S., LI, J. y LIU, F. 2011. Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. *Renewable Energy*, 36, 1517-1522.

CHEN, C., LIN, C. y LIN, C. 2002. Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process. *Applied microbiology and biotechnology*, 58, 224-228.

CHEN, S., LEE, K., LO, Y., CHEN, W., WU, J., LIN, C. y CHANG, J. 2008. Batch and continuous biohydrogen production from starch hydrolysate by *Clostridium* species. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1803-1812.

- CHERNICHARO, C. 1997. Principios do Tratamiento Biológico de Aguas Residuárias. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Engenharia Sanitaria e Ambiental. Vol V. Brasil.
- CHERNICHARO, C. 2007. *Principios do tratamento biológico de águas residuárias. Reactores anaeróbios, Vol V. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Brasil.*
- CLAASSEN, P., VAN LIER, J., CONTRERAS, A., VAN NIEL, E., SIJTSMA, L., STAMS, A., DE VRIES, S. y WEUSTHUIS, R. 1999. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Applied microbiology and biotechnology*, 52, 741-755.
- CLARK, L., ZHANG, R. y UPADHYAYA, S. 2012. The effect of low pressure and mixing on biological hydrogen production via anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 11504-11513.
- COATES, J., COUGHLAN, M. y COLLERAN, E. 1996. Simple method for the measurement of the hydrogenotrophic methanogenic activity of anaerobic sludges. *Journal of Microbiological Methods*, 26, 237-246.
- DAS, D. y VEZIROĞLU, N. 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26, 13-28.
- DAVILA, G., DE LEÓN, A., ALATRISTE, F. y RAZO, E. 2011. The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. *Biomass and Bioenergy*, 35, 3174-3181.
- DÁVILA, G. y RAZO, E. 2007. Producción biológica de hidrógeno por vía fermentativa: Fundamentos y perspectivas. *BioTecnología*.
- DEVI, M., MOHAN, S., MOHANAKRISHNA, G. y SARMA, P. 2010. Regulatory influence of CO₂ supplementation on fermentative hydrogen production process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 10701-10709.
- DINAMARCA, C. y BAKKE, R. 2009. Apparent hydrogen consumption in acid reactors: observations and implications. *Water Science and Technology*, 59, 1441.
- DINAMARCA, C. y BAKKE, R. 2012. Simultaneous hydrogen production and consumption in Anaerobic mixed culture fermentation.
- DUBOIS, M., GILLES, K., HAMILTON, J., REBERS, P. y SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28, 350-356.
- FABIANO, B. y PEREGO, P. 2002. Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 149-156.
- FANG, H., LI, C. y ZHANG, T. 2006. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 683-692.
- FANG, H. y LIU, H. 2002. *Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. Bioresource technology*. 82, 87-93.
- FERNANDES, B., PEIXOTO, G., ALBRECHT, F., SAAVEDRA, N. y ZAIAT, M. 2010. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. *Energy for Sustainable Development*, 14, 143-148.
- FERNANDES JR, A. 1995. Digestão anaeróbia de manipueira com separação de fases: cinética da fase acidogênica. *Botucatu: UNESP/FCA*.

FIELD, J. 1987. Medición de parámetros: arranque y operación de sistemas de flujo ascendente con manto de lodo UASB. Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle, Cali (Colombia). Disponible en: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=107757&indexSearch=ID>.

FIELD, J., SIERRA, R. y VAN HAANDEL, A. 1995. Effect Wastewater characteristics and environmental factors. En: Curso Internacional de Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales. Santiago de Cali, Universidad de Valle.

FORESTI, E. y VAN HAANDEL, A. 1998. Fundamentos do Tratamento Anaeróbico. En: Tratamento de Esgotos Sanitários por Processo Anaeróbico e disposição controlada no solo. PROSAB, Brasil.

GINKEL, S. y LOGAN, B. 2005. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research*, 39, 3819-3826.

GINKEL, S., SUNG, S. y LAY, J. 2001. Biohydrogen Production as a Function of pH and Substrate Concentration. *Environmental Science & Technology*, 35, 4726-4730.

GODOI, L. 2010. *Produção de hidrogênio a partir de sacarose em reator anaerobio de leito fixo ordenado tendo espuma de poliuretano como material suporte*. Univeridade de Sao Paulo.

GUYOT, J., GUTIERREZ, G. y ROJAS, M. 1993. Anaerobic microbial counts of different potential anaerobic inocula. *Applied microbiology and biotechnology*, 40, 139-142.

HAFEZ, H., NAKHLA, G., EL NAGGAR, M. y ELSHARNOUBY, O. 2013. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 4945-4966.

HALLENBECK, P. 2009. Fermentative hydrogen production: principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7379-7389.

HALLENBECK, P. 2013. Chapter 2 - Fundamentals of Biohydrogen. In: LARROCHE, A. P.-S. C. C. H. (ed.) *Biohydrogen*. Amsterdam: Elsevier.

HALLENBECK, P. y BENEMANN, J. 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1185-1193.

HALLENBECK, P. y GHOSH, D. 2009. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology*, 27, 287-297.

HAWKES, F., DINSDALE, R., HAWKES, D. y HUSSY, I. 2002. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1339-1347.

HORIUCHI, J., SHIMIZU, T., TADA, K., KANNO, T. y KOBAYASHI, M. 2002. Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control. *Bioresource Technology*, 82, 209-213.

HORVATH, R., OROSZ, T., BALINT, B., WESSLING, M., KOOPS, G., KAPANTAIDAKIS, G. y BELAFI-BAKO, K. 2004. Application of gas separation to recover biohydrogen produced by *Thiocapsa roseopersicina*. *Desalination*, 163, 261-265.

HURTADO, M. y MUÑOZ, D. 2014. Efecto del pre-tratamiento térmico de un inoculo en la producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura de glucosa. Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle, Cali (Colombia).

HUSSY, I., HAWKES, F., DINSDALE, R. y HAWKES, D. 2005. Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30, 471-483.

- HWANG, M., JANG, N., HYUN, S. y KIM, S. 2004. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. *Journal of Biotechnology*, 111, 297-309.
- INTANOO, P., RANGSANVIGIT, P., MALAKUL, P. y CHAVADEJ, S. 2014. Optimization of separate hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) system under thermophilic operation. *Bioresource Technology*, 173, 256-265.
- JONES, D. y WOODS, D. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological reviews*, 50, 484.
- JONG, W. 2009. Sustainable hydrogen production by thermochemical biomass processing. In: Gupta, R.B. (Ed.), *Hydrogen Fuel: Production, Transport, and Storage*. Taylor & Francis Group, LLC.
- KANNAIAH, R., SARKAR, O. y VENKATA, S. 2013. Regulation of biohydrogen production by heat-shock pretreatment facilitates selective enrichment of *Clostridium* sp. *International Journal of Hydrogen Energy*.
- KAWAGOSHI, Y., HINO, N., FUJIMOTO, A., NAKAO, M., FUJITA, Y., SUGIMURA, S. y FURUKAWA, K. 2005. Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 524-530.
- KHANAL, S. 2009a. *Anaerobic biotechnology for bioenergy production: principles and applications*, John Wiley & Sons.
- KHANAL, S. 2009b. Environmental factors. *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications*, 43.
- KHANAL, S., CHEN, W., LI, L. y SUNG, S. 2004. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 1123-1131.
- KIM, D., KIM, S., KIM, H., KIM, S. y SHIN, H. 2011a. Sewage sludge addition to food waste synergistically enhances hydrogen fermentation performance. *Bioresource Technology*, 102, 8501-8506.
- KIM, D., LEE, D. y KIM, S. 2011b. Enhanced biohydrogen production from tofu residue by acid/base pretreatment and sewage sludge addition. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 13922-13927.
- KIM, D., SHIN, H. y KIM, S. 2012. Enhanced H₂ fermentation of organic waste by CO₂ sparging. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 15563-15568.
- KIM, J., HAN, G., OH, B., CHUN, Y., EOM, C. y KIM, S. 2008. Volumetric scale-up of a three stage fermentation system for food waste treatment. *Bioresource Technology*, 99, 4394-4399.
- KIM, S. y SHIN, H. 2008. Effects of base-pretreatment on continuous enriched culture for hydrogen production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 5266-5274.
- KRAEMER, J. y BAGLEY, D. 2007. Improving the yield from fermentative hydrogen production. *Biotechnology Letters*, 29, 685-695.
- LABORDE, M. y RUBIERA, F. 2010. La energia del hidrogeno.
- LAMAISON, F. 2012. Aplicação da água residuária do processamento da mandioca como substrato para a produção de hidrogênio por processo fermentativo.
- LAMAISON, F., FRAGATA, R., ANTÔNIO, R., AMANTE, E. y REGINATTO, V. 2014. Pretreatment on anaerobic sludge for enhancement of biohydrogen production from cassava processing wastewater. Disponible en: <http://www.periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/view/17736>. *Acta Scientiarum. Technology*, 36, 437-444.

- LAY, J. 2000. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 269-278.
- LEAÑO, E. y BABEL, S. 2012. Effects of pretreatment methods on cassava wastewater for biohydrogen production optimization. *Renewable Energy*, 39, 339-346.
- LEE, H., SALERNO, M. y RITTMANN, B. 2008. Thermodynamic Evaluation on H₂ Production in Glucose Fermentation. *Environmental Science & Technology*, 42, 2401-2407.
- LEE, K., TSENG, T., LIU, Y. y HSIAO, Y. 2012. Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 15556-15562.
- LEE, K., WU, J., LO, Y., LO, Y., LIN, P. y CHANG, J. 2004. Anaerobic hydrogen production with an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 87, 648-657.
- LESLIE, C., DAIGGER, G. y LIM, H. 1996. Biological wastewater treatment. 2^a ed. U.S.A, New York.
- LETTINGA, G. 1995. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 3-28.
- LEVIN, D., PITT, L. y LOVE, M. 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 173-185.
- LI, C. y FANG, H. 2007. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37, 1-39.
- LIAO, J. 2013. Toward a Biological Replacement of Petroleum.
- LIN, C., CHANG, C. y HUNG, C. 2008. Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 2445-2453.
- LIN, C. y CHANG, R. 2004. Fermentative hydrogen production at ambient temperature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 715-720.
- LIN, C., HUNG, C., CHEN, C., CHUNG, W. y CHENG, L. 2006. Effects of initial cultivation pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures. *Process Biochemistry*, 41, 1383-1390.
- LIN, C. y LAY, C. 2004. Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 275-281.
- LIPMAN, T. 2011. An overview of hydrogen production and storage systems with renewable hydrogen case studies. In: Energy Efficiency and renewable Energy Fuel Cell Technologies Program.
- LIU, C., WHANG, L., REN, W. y LIN, P. 2011. The effect of pH on the production of biohydrogen by clostridia: Thermodynamic and metabolic considerations. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 439-449.
- LIU, G. y SHEN, J. 2004. Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98, 251-256.
- LIU, H. y FANG, H. 2003. Hydrogen production from wastewater by acidogenic granular sludge. *Water Science & Technology*, 47, 153-158.
- LOSS, R. 2011. Avaliação da produção de hidrogênio por consórcio bacteriano fotoheterotrófico.

- LUO, G., XIE, L., ZOU, Z., WANG, W. y ZHOU, Q. 2010a. Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. *Bioresource Technology*, 101, 959-964.
- LUO, G., XIE, L., ZOU, Z., WANG, W. y ZHOU, Q. 2010b. Exploring optimal conditions for thermophilic fermentative hydrogen production from cassava stillage. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 6161-6169.
- LUO, G., XIE, L., ZOU, Z., ZHOU, Q. y WANG, J. 2010c. Fermentative hydrogen production from cassava stillage by mixed anaerobic microflora: Effects of temperature and pH. *Applied Energy*, 87, 3710-3717.
- MADIGAN, M., MARTINKO, J., PARKER, J., FERNÁNDEZ, E., FERNÁNDEZ, C. y PÉREZ, M. 2004. *Brock biología de los microorganismos*, SciELO Espana.
- MAINTINGUER, S., FERNANDES, B., DUARTE, I., SAAVEDRA, N., ADORNO, M. y VARESCHE, M. 2008. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4309-4317.
- MANDAL, B., NATH, K. y DAS, D. 2006. Improvement of Biohydrogen Production Under Decreased Partial Pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnology Letters*, 28, 831-835.
- MARQUES, P., BARTOLOMEU, M., TOMÉ, M. y NEVES, L. 2009. Bio-hydrogen production from glycerol by a strain of *Enterobacter aerogenes*.
- MASSET, J., HILIGSMANN, S., HAMILTON, C., BECKERS, L., FRANCK, F. y THONART, P. 2010. Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 3371-3378.
- MIHELICIC, J. 2001. *Fundamentos de ingeniería ambiental*, Limusa Wiley.
- MIZUNO, O., DINSDALE, R., HAWKES, F., HAWKES, D. y NOIKE, T. 2000. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource Technology*, 73, 59-65.
- MOHAMMADI, P., IBRAHIM, S., ANNUAR, M., GHAFARI, S., VIKINESWARY, S. y ZINATIZADEH, A. 2012a. Influences of Environmental and Operational Factors on Dark Fermentative Hydrogen Production: A Review. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 40, 1297-1305.
- MOHAMMADI, P., IBRAHIM, S. y MOHAMAD ANNUAR, M. S. 2012b. Effects of biomass, COD and bicarbonate concentrations on fermentative hydrogen production from POME by granulated sludge in a batch culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 17801-17808.
- MOHAMMADI, P., IBRAHIM, S., MOHAMAD, M. y LAW, S. 2011. Effects of different pretreatment methods on anaerobic mixed microflora for hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent. *Journal of Cleaner Production*, 19, 1654-1658.
- MOHAN, S., CHANDRASEKHAR, K., CHIRANJEEVI, P. y BABU, P. 2013. Chapter 10 - Biohydrogen Production from Wastewater. In: LARROCHE, A. P.-S. C. C. H. (ed.) *Biohydrogen*. Amsterdam: Elsevier.
- MOHAN, S., MOHANAKRISHNA, G. y SRIKANTH, S. 2011. Chapter 22 - Biohydrogen Production from Industrial Effluents. In: GNANSOUNOU, A. P. L. C. R.-G. D. (ed.) *Biofuels*. Amsterdam: Academic Press.
- MOHD, N., RAHMAN, N., MAN, H., MOHD, M. y HASSAN, M. 2011. Microbial characterization of hydrogen-producing bacteria in fermented food waste at different pH values. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 9571-9580.

MONTEGGIA, L. Proposta de metodologia para avaliação do parâmetro Atividade Metanogênica Específica. Congresso Brasileiro de Engenharia sanitária e Ambiental., 1997.

MÜLLER, N., WORM, P., SCHINK, B., STAMS, A. y PLUGGE, C. 2010. Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: from genomes to reaction mechanisms. *Environmental Microbiology Reports*, 2, 489-499.

MUÑOZ, K., POGGI, H., GARCÍA, J., PONCE, M., RAMOS, A., BARRERA, J., ROBLES, I., RUIZ, N., VILLA, L. y RINDERKNECHT, N. 2014. Cheese whey as substrate of batch hydrogen production: Effect of temperature and addition of buffer. *Waste Management and Research*, 32, 434-440.

NAKHLA, G., KARAMANEV, D., MARGARITIS, A., REID, G. y BAGHCHEHSARAEI, B. 2008. The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4064-4073.

NARASU, L. y URBANIEC, K. 2012. International conference on advances in biological hydrogen production and applications ICABHPA 2012. *Journal of Cleaner Production*.

NATH, K., KUMAR, A. y DAS, D. 2006. Effect of some environmental parameters on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* DM11. *Canadian journal of microbiology*, 52, 525-532.

NIE, Y., LIU, H., DU, G. y CHEN, J. 2007. Enhancement of acetate production by a novel coupled syntrophic acetogenesis with homoacetogenesis process. *Process Biochemistry*, 42, 599-605.

NOIKE, T., TAKABATAKE, H., MIZUNO, O. y OHBA, M. 2002. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1367-1371.

NORLI, I., HO, Y., FISCHER, K., KRANERT, M. y BOLEY, A. Biodegradability Assessment of Bio-flocculant via Anaerobic and Aerobic Test. International Conference on Environment Science and Engineering (ICESE), Bali, Indonesia, 2011.

O-THONG, S., HNIMAN, A., PRASERTSAN, P. y IMAI, T. 2011. Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 3409-3416.

OH, S. y LOGAN, B. 2005. Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Research*, 39, 4673-4682.

OROZCO, A. y SALAZAR, A. 1985. Tratamiento biológico de las aguas residuales. Universidad de Antioquia, Colombia. Disponible en: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=122544&indexSearch=ID>.

PAKARINEN, O., LEHTOMÄKI, A. y RINTALA, J. 2008. Batch dark fermentative hydrogen production from grass silage: The effect of inoculum, pH, temperature and VS ratio. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 594-601.

PARK, W., HYUN, S., OH, S., LOGAN, B. y KIM, S. 2005. Removal of headspace CO₂ increases biological hydrogen production. *Environmental Science & Technology*, 39, 4416-4420.

PATTRA, S., ASSAWAMONGKHOLSIRI, T. y REUNGSANG, A. 2013. Effect of acid, heat and combined acid-heat pretreatments of anaerobic sludge on hydrogen production by anaerobic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*.

PAVLOSTATHIS, S. 2011. Kinetics and Modeling of Anaerobic Treatment and Biotransformation Processes. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. Burlington: Academic Press.

PENTEADO, E., LAZARO, C., SAKAMOTO, I. y ZAIAT, M. 2013. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 6137-6145.

PÉREZ, A. 2007. Optimización de un filtro anaerobio en escala real para el tratamiento de aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca. Tesis Maestría. Cali, Colombia: Universidad del Valle, Posgrado en Ingeniería Sanitaria y Ambiental.

PÉREZ, A. y TORRES, P. 2011. Indices de alcalinidad para el control del tratamiento anaerobio de aguas residuales fácilmente acidificables. *Revista Ingeniería y Competitividad*, 10, 41-52.

PIRC, E., NOVOSEL, B. y BUKOVEC, P. 2012. Comparison of GC and OxiTop analysis of biogas composition produced by anaerobic digestion of glucose in cyanide inhibited systems. *Acta Chim. Slov*, 59, 398-404.

RAMÍREZ, L. 1998. Adecuación de una metodología para la evaluación de potenciales semillas para la inoculación de reactores anaerobios. Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle. Cali, Colombia. Disponible en: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=93199&indexSearch=ID#refine>.

REGINATTO, V., LAMAISSON, F., AMANTE, E. y ANTÔNIO, R. 2011. METHODS: Long-term effect of nutrient supplementation of cassava wastewater on biohydrogen production by mixed culture. *Industrial Biotechnology*, 7, 143-150.

RIECHMANN, J. 2009. La Crisis Energética. Algunas Consideraciones Políticas. *Economía Industrial. Ministerio de Industria, Turismo y Comercio*, 371.

RITTMAN, B. y MC.CARTY 2001. Biotecnología del medio ambiente. Mc Grawhill, España.

ROBLEDO, P., MUÑOZ, K., POGGI, H., RÍOS, E., CALVA, G., ORTEGA, L., RINDERKNECHT, N., ESTRADA, C., PONCE, T. y SALAZAR, A. 2013. The influence of total solids content and initial pH on batch biohydrogen production by solid substrate fermentation of agroindustrial wastes. *Journal of Environmental Management*, 128, 126-137.

RODRIGUEZ, J. 2012. Arranque y operación de reactores anaerobios. Practica 6: aclimatacion de inoculos aerobios y anaerobios. Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

ROJAS, O. 1987. Relación alcalinidad-ácidos grasos volátiles. *Arranque y operación de sistemas de flujo ascendente con manto de lodo UASB: manual del curso. Universidad del Valle. Cali, Colombia*.

ROJAS, O. 2004. Capacidad tampón en reactores anaerobios. Curso sobre tratamiento anaerobio de aguas residuales, Programa de Posgrado en Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

ROMERO, J. 2004. Tratamiento de aguas residuales, teoría y principios de diseño. Bogotá, CO, *Escuela Colombiana de Ingenieros*.

ROZZI, A. Parámetros de operación y control de los procesos anaerobios. Proceedings of the third seminar DAAR, Valladolid, 1986. 31-39.

SAADY, N. 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*.

SARATALE, G., SARATALE, R. y CHANG, J. 2013. Chapter 9 - Biohydrogen from Renewable Resources. In: LARROCHE, A. P.-S. C. C. H. (ed.) *Biohydrogen*. Amsterdam: Elsevier.

- SCHINK, B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 262-280.
- SPEECE, R. 1996. Anaerobic Biotechnology for industrial wastewaters. USA.
- SRIKANTH, S., VENKATA, S., LALIT, V. y SARMA, P. 2010. Metabolic shift and electron discharge pattern of anaerobic consortia as a function of pretreatment method applied during fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 10693-10700.
- SUNG, S., RASKIN, L., DUANGMANEE, T., PADMASIRI, S. y SIMMONS, J. Hydrogen production by anaerobic microbial communities exposed to repeated heat treatments. Proceedings of the 2002 US DOE hydrogen program review, 2002. 10-17.
- TEKUCHEVA, D. y TSYGANKOV, A. 2012. Combined biological hydrogen-producing systems: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48, 319-337.
- TEMUDO, M., KLEEREBEZEM, R. y VAN LOOSDRECHT, M. 2007. Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: A chemostat study. *Biotechnology and Bioengineering*, 98, 69-79.
- TORRES, P. 2010. Una Mirada a la Agroindustria de Extracción de Almidón de Yuca, desde la Estandarización de Procesos. *Rev. EIA. Esc. Ing. Antioq*, 23-38.
- TORRES, P., CRUZ, C., MARMOLEJO, L., CAJIGAS, A. y PÉREZ, A. 2006. Producción más limpia aplicada al proceso de extracción de almidón de yuca. *Informe final. Colciencias, Universidad del Valle, Colombia*.
- TORRES, P. y PÉREZ, A. 2011. Actividad Metanogénica Específica: una herramienta de control y optimización de sistemas de tratamiento anaerobio de aguas residuales. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*, 9, 5-14.
- TORRES, P., PÉREZ, A., CAJIGAS, Á., OTERO, A. M. y GONZÁLEZ, M. 2011. Selección de acondicionadores químicos para el tratamiento anaerobio de aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*, 66-74.
- TREVISAN, V. 2010. *Proposta de metodologia para determinação da atividade hidrogênica específica. Doutor em Recursos hídricos y saneamento ambiental. Programa de pós-graduação em Recursos Hídricos y Saneamento Ambiental*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- VALDEZ, I. y POGGI, H. 2009. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, 1000-1013.
- VALDEZ, I., RÍOS, E., ESPARZA, F., CECCHI, F. y POGGI, H. 2005. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30, 1383-1391.
- VAN DEN HEUVEL, J., VERSCHUREN, P., BEEFTINK, H. y DE BEER, D. 1992. Determination of the critical concentration of inhibitory products in a repeated fed-batch culture. *Biotechnology techniques*, 6, 33-38.
- VON SPERLING, M. y CHERNICHARO, C. 2005. *Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions*.
- WANG, C. y CHANG, J. 2007. Continuous Biohydrogen Production from Starch with Granulated Mixed Bacterial Microflora†. *Energy and Fuels*, 22, 93-97.

WANG, C., LIN, P. y CHANG, J. 2006. Fermentative conversion of sucrose and pineapple waste into hydrogen gas in phosphate-buffered culture seeded with municipal sewage sludge. *Process Biochemistry*, 41, 1353-1358.

WANG, J. y WAN, W. 2009a. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 799-811.

WANG, J. y WAN, W. 2009b. Kinetic models for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 3313-3323.

WPCF 1987. Anaerobic Sludge Digestion, 2nd edn. Water Pollution Control Federation, Alexandria, VA, USA. 17.

XIAO, B., HAN, Y. y LIU, J. 2010. Evaluation of biohydrogen production from glucose and protein at neutral initial pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 6152-6160.

YASIN, N., MUMTAZ, T., HASSAN, M. y RAHMAN, N. 2013. Food waste and food processing waste for biohydrogen production: A review. *Journal of Environmental Management*, 130, 375-385.

YIN, F., XU, L., LIU, J., ZHANG, W., HUANG, Z. y ZHAO, X. 2013. Mutual Symbiotic Methanogenic Process between Acetotrophic and Hydrogenotrophic Methanogens during Anaerobic Digestion. *Advanced Materials Research*, 716, 470-474.

ZHANG, T., LIU, H. y FANG, H. 2003. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *Journal of Environmental Management*, 69, 149-156.

ZHENG, X. y YU, H. 2004. Roles of pH in biologic production of hydrogen and volatile fatty acids from glucose by enriched anaerobic cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 112, 79-90.

ANEXOS

ANEXO 1

Datos para la determinación teórica de la Actividad Metanogénica Especifica (AME) y Actividad Hidrogénica Especifica (AHE) del Lodo Aclimatado, y Pre-tratado Química y Térmicamente

Tabla A1.1.Datos de presiones para la determinación teórica de la AME y AHE

| Fecha (D/M/A) | Tiempo Acumulado (h) | Temperatura (°C) | Reactor No.1 | Reactor No.2 | Reactor No.3 | Reactor No.4 | Reactor No.5 | Reactor No.6 | Reactor No.7 | Reactor No.8 | Reactor No.9 | Reactor No.10 | Reactor No.11 | Reactor No.12 |
|------------------|-------------------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| 17/07/2014 | 0,00 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 17/07/2014 | 1,00 | 30 | 185 | 177 | 94 | 88 | 165 | 84 | -17,00 | -13,00 | -9,00 | -7,00 | -16,00 | -18,00 |
| 18/07/2014 | 16,00 | 30 | -18 | 33 | -25 | -15 | 16 | -8 | -47,00 | -54,00 | 329,00 | 393,00 | -101,00 | -85,00 |
| 18/07/2014 | 18,00 | 30 | -58 | 10 | -46 | -28 | -6 | -18 | -44,00 | -47,00 | 372,00 | 370,00 | 0,00 | 11,00 |
| 18/07/2014 | 21,00 | 30 | -89 | -40 | -95 | -46 | -29 | -53 | -13,00 | 7,00 | 408,00 | 342,00 | 147,00 | 91,00 |
| 18/07/2014 | 24,00 | 30 | -88 | -52 | -101 | -54 | -45 | -78 | 77,00 | 154,00 | 532,00 | 356,00 | 254,00 | 165,00 |
| 19/07/2014 | 41,50 | 30 | -136 | -102 | -159 | -179 | -92 | -174 | 1355,00 | 1238,00 | 532,00 | 454,00 | 666,00 | 575,00 |
| 19/07/2014 | 45,00 | 30 | -142 | -119 | -159 | -152 | -97 | -173 | 1355,00 | 1238,00 | 563,00 | 454,00 | 666,00 | 575,00 |
| 19/07/2014 | 48,00 | 30 | -95 | -120 | -170 | -154 | -93 | -166 | 1489,00 | 1428,00 | 563,00 | 471,00 | 725,00 | 622,00 |
| 20/07/2014 | 65,50 | 30 | -148 | -160 | -198 | -184 | -108 | -175 | 1462,00 | 1417,00 | 569,00 | 462,00 | 704,00 | 633,00 |
| 20/07/2014 | 68,58 | 30 | -137 | -158 | -197 | -173 | -103 | -173 | 1443,00 | 1387,00 | 533,00 | 459,00 | 807,00 | 727,00 |
| 20/07/2014 | 70,50 | 30 | -132 | -152 | -182 | -161 | -97 | -166 | 1436,00 | 1379,00 | 511,00 | 472,00 | 801,00 | 723,00 |
| 21/07/2014 | 90,00 | 30 | -140 | -156 | -183 | -169 | -101 | -188 | 1431,00 | 1371,00 | 508,00 | 472,00 | 793,00 | 717,00 |
| 21/07/2014 | 92,17 | 30 | -136 | -150 | -175 | -159 | -95 | -180 | 1407,00 | 1349,00 | 507,00 | 566,00 | 514,00 | 676,00 |
| 21/07/2014 | 95,50 | 30 | -134 | -152 | -173 | -159 | -95 | -178 | 1398,00 | 1343,00 | 494,00 | 596,00 | 472,00 | 661,00 |
| 22/07/2014 | 112,00 | 30 | -133 | -147 | -172 | -155 | -95 | -172 | 1384,00 | 1330,00 | 496,00 | 615,00 | 433,00 | 614,00 |
| 22/07/2014 | 119,00 | 30 | -129 | -142 | -172 | -149 | -86 | -166 | 1223,00 | 1316,00 | 489,00 | 624,00 | 373,00 | 427,00 |
| 23/07/2014 | 137,33 | 30 | -124 | -136 | -172 | -148 | -84 | -164 | 1012,00 | 1307,00 | 482,00 | 622,00 | 348,00 | 374,00 |
| 23/07/2014 | 141,00 | 30 | -120 | -130 | -171 | -142 | -77 | -157 | 715,00 | 1281,00 | 480,00 | 530,00 | 309,00 | 284,00 |
| 24/07/2014 | 160,00 | 30 | -119 | -127 | -175 | -142 | -74 | -156 | 703,00 | 1266,00 | 464,00 | 459,00 | 310,00 | 273,00 |
| 24/07/2014 | 164,67 | 30 | -113 | -118 | -166 | -134 | -64 | -146 | 688,00 | 1246,00 | 463,00 | 221,00 | 292,00 | 237,00 |
| 24/07/2014 | 167,50 | 30 | -107 | -115 | -165 | -134 | -62 | -143 | 705,00 | 1237,00 | 453,00 | 179,00 | 285,00 | 230,00 |
| 25/07/2014 | 184,00 | 30 | -108 | -113 | -166 | -135 | -84 | -138 | 707,00 | 1204,00 | 452,00 | 155,00 | 290,00 | 236,00 |
| 25/07/2014 | 188,17 | 30 | -99 | -105 | -160 | -123 | -78 | -130 | 711,00 | 1157,00 | 450,00 | 50,00 | 257,00 | 198,00 |
| 25/07/2014 | 190,75 | 30 | -100 | -105 | -160 | -127 | -78 | -130 | 718,00 | 1144,00 | 432,00 | 47,00 | 262,00 | 190,00 |
| 26/07/2014 | 208,67 | 30 | -97 | -97 | -156 | -126 | -64 | -123 | 720,00 | 1124,00 | 435,00 | 34,00 | 262,00 | 176,00 |
| 26/07/2014 | 212,00 | 30 | -92 | -92 | -150 | -118 | -61 | -113 | 715,00 | 943,00 | 428,00 | -17,00 | 244,00 | 137,00 |
| 28/07/2014 | 256,33 | 30 | -83 | -71 | -133 | -107 | -5 | -71 | 721,00 | 910,00 | 412,00 | -15,00 | 251,00 | 144,00 |
| 28/07/2014 | 260,00 | 30 | -79 | -68 | -130 | -104 | 1 | -65 | 717,00 | 557,00 | 415,00 | -52,00 | 242,00 | 116,00 |
| 30/07/2014 | 308,50 | 30 | -70 | -38 | -112 | -98 | 99 | 18 | 721,00 | 560,00 | 399,00 | -49,00 | 247,00 | 119,00 |
| 31/07/2014 | 331,25 | 30 | -55 | -5 | -85 | -77 | 176 | 95 | 702,00 | 532,00 | 398,00 | -55,00 | 263,00 | 107,00 |
| 02/08/2014 | 379,25 | 30 | -32 | 57 | -37 | -49 | 375 | 287 | 718,00 | 547,00 | 370,00 | -59,00 | 270,00 | 103,00 |
| 05/08/2014 | 454,00 | 30 | 0 | 123 | -1 | 5 | 47 | 35 | 709,00 | 535,00 | 379,00 | -81,00 | 276,00 | 86,00 |

Tabla A1.2.Datos de volúmenes para la determinación teórica de AME y AME

| Fecha (D/M/A) | Tiempo Acumulado (h) | Temperatura (°C) | Reactor No.1 | Reactor No.2 | Reactor No.3 | Reactor No.4 | Reactor No.5 | Reactor No.6 | Reactor No.7 | Reactor No.8 | Reactor No.9 | Reactor No.10 | Reactor No.11 | Reactor No.12 |
|------------------|-------------------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| 17/07/2014 | 0,00 | 30 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 17/07/2014 | 1,00 | 30 | 9,06 | 1,34 | 0,71 | 0,66 | 1,25 | 0,63 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 18/07/2014 | 16,00 | 30 | 9,06 | 1,34 | 0,71 | 0,66 | 1,25 | 0,63 | 0,00 | 0,00 | 1,85 | 2,19 | 0,00 | 0,00 |
| 18/07/2014 | 18,00 | 30 | 9,06 | 1,34 | 0,71 | 0,66 | 1,25 | 0,63 | 0,02 | 0,04 | 2,09 | 2,19 | 0,55 | 0,53 |
| 18/07/2014 | 21,00 | 30 | 9,06 | 1,34 | 0,71 | 0,66 | 1,25 | 0,63 | 0,19 | 0,33 | 2,29 | 2,19 | 1,36 | 0,96 |
| 18/07/2014 | 24,00 | 30 | 9,10 | 1,34 | 0,71 | 0,66 | 1,25 | 0,63 | 0,68 | 1,14 | 2,97 | 2,27 | 1,95 | 1,37 |
| 19/07/2014 | 41,50 | 30 | 9,10 | 1,34 | 0,71 | 0,66 | 1,25 | 0,63 | 7,69 | 7,08 | 2,97 | 2,81 | 4,21 | 3,62 |
| 19/07/2014 | 45,00 | 30 | 9,10 | 1,34 | 0,71 | 0,87 | 1,25 | 0,64 | 7,69 | 7,08 | 3,14 | 2,81 | 4,21 | 3,62 |
| 19/07/2014 | 48,00 | 30 | 11,41 | 1,34 | 0,71 | 0,87 | 1,28 | 0,70 | 8,42 | 8,13 | 3,14 | 2,90 | 4,53 | 3,88 |
| 20/07/2014 | 65,50 | 30 | 11,41 | 1,34 | 0,71 | 0,87 | 1,28 | 0,70 | 8,42 | 8,13 | 3,17 | 2,90 | 4,53 | 3,94 |
| 20/07/2014 | 68,58 | 30 | 11,94 | 1,35 | 0,72 | 0,95 | 1,31 | 0,71 | 8,42 | 8,13 | 3,17 | 2,90 | 5,09 | 4,45 |
| 20/07/2014 | 70,50 | 30 | 12,19 | 1,40 | 0,83 | 1,04 | 1,36 | 0,76 | 8,42 | 8,13 | 3,17 | 2,97 | 5,09 | 4,45 |
| 21/07/2014 | 90,00 | 30 | 12,19 | 1,40 | 0,83 | 1,04 | 1,36 | 0,76 | 8,42 | 8,13 | 3,17 | 2,97 | 5,09 | 4,45 |
| 21/07/2014 | 92,17 | 30 | 12,38 | 1,44 | 0,89 | 1,12 | 1,41 | 0,82 | 8,42 | 8,13 | 3,17 | 3,49 | 5,09 | 4,45 |
| 21/07/2014 | 95,50 | 30 | 12,48 | 1,44 | 0,91 | 1,12 | 1,41 | 0,84 | 8,42 | 8,13 | 3,17 | 3,65 | 5,09 | 4,45 |
| 22/07/2014 | 112,00 | 30 | 12,53 | 1,48 | 0,91 | 1,15 | 1,41 | 0,88 | 8,42 | 8,13 | 3,18 | 3,76 | 5,09 | 4,45 |
| 22/07/2014 | 119,00 | 30 | 12,73 | 1,52 | 0,91 | 1,19 | 1,47 | 0,93 | 8,42 | 8,13 | 3,18 | 3,80 | 5,09 | 4,45 |
| 23/07/2014 | 137,33 | 30 | 12,97 | 1,56 | 0,91 | 1,20 | 1,49 | 0,94 | 8,42 | 8,13 | 3,18 | 3,80 | 5,09 | 4,45 |
| 23/07/2014 | 141,00 | 30 | 13,17 | 1,61 | 0,92 | 1,25 | 1,54 | 1,00 | 8,42 | 8,13 | 3,18 | 3,80 | 5,09 | 4,45 |
| 24/07/2014 | 160,00 | 30 | 13,22 | 1,63 | 0,92 | 1,25 | 1,56 | 1,00 | 8,42 | 8,13 | 3,18 | 3,80 | 5,10 | 4,45 |
| 24/07/2014 | 164,67 | 30 | 13,51 | 1,70 | 0,99 | 1,31 | 1,64 | 1,08 | 8,42 | 8,13 | 3,18 | 3,80 | 5,10 | 4,45 |
| 24/07/2014 | 167,50 | 30 | 13,80 | 1,72 | 1,00 | 1,31 | 1,65 | 1,10 | 8,51 | 8,13 | 3,18 | 3,80 | 5,10 | 4,45 |
| 25/07/2014 | 184,00 | 30 | 13,80 | 1,74 | 1,00 | 1,31 | 1,65 | 1,14 | 8,53 | 8,13 | 3,18 | 3,80 | 5,13 | 4,48 |
| 25/07/2014 | 188,17 | 30 | 14,24 | 1,80 | 1,04 | 1,40 | 1,70 | 1,20 | 8,55 | 8,13 | 3,18 | 3,80 | 5,13 | 4,48 |
| 25/07/2014 | 190,75 | 30 | 14,24 | 1,80 | 1,04 | 1,40 | 1,70 | 1,20 | 8,59 | 8,13 | 3,18 | 3,80 | 5,15 | 4,48 |
| 26/07/2014 | 208,67 | 30 | 14,39 | 1,86 | 1,07 | 1,41 | 1,81 | 1,25 | 8,60 | 8,13 | 3,20 | 3,80 | 5,15 | 4,48 |
| 26/07/2014 | 212,00 | 30 | 14,64 | 1,90 | 1,12 | 1,47 | 1,83 | 1,33 | 8,60 | 8,13 | 3,20 | 3,80 | 5,15 | 4,48 |
| 28/07/2014 | 256,33 | 30 | 15,08 | 2,05 | 1,25 | 1,55 | 2,25 | 1,65 | 8,63 | 8,13 | 3,20 | 3,82 | 5,19 | 4,52 |
| 28/07/2014 | 260,00 | 30 | 15,27 | 2,08 | 1,27 | 1,57 | 2,30 | 1,69 | 8,63 | 8,13 | 3,21 | 3,82 | 5,19 | 4,52 |
| 30/07/2014 | 308,50 | 30 | 15,71 | 2,30 | 1,41 | 1,62 | 3,04 | 2,32 | 8,65 | 8,14 | 3,21 | 3,83 | 5,22 | 4,54 |
| 31/07/2014 | 331,25 | 30 | 16,45 | 2,55 | 1,61 | 1,78 | 3,62 | 2,90 | 8,65 | 8,14 | 3,21 | 3,83 | 5,31 | 4,54 |
| 02/08/2014 | 379,25 | 30 | 17,57 | 3,02 | 1,97 | 1,99 | 5,12 | 4,35 | 8,74 | 8,22 | 3,21 | 3,83 | 5,35 | 4,54 |
| 05/08/2014 | 454,00 | 30 | 19,14 | 3,52 | 2,24 | 2,39 | 5,12 | 4,35 | 8,74 | 8,22 | 3,26 | 3,83 | 5,38 | 4,54 |

ANEXO 2

Seguimiento del experimento

Tabla A2.1.Datos de presiones totales de biogás en reactores acidogénicos con agua residual agroindustrial

| Tiempo (hora) | Temperatura (°C) | Reactor No.1 | Reactor No.2 | Reactor No.3 | Reactor No.4 | Reactor No.5 | Reactor No.6 | Reactor No.7 | Reactor No.8 | Reactor No.9 | Reactor No.10 | Reactor No.11 | Reactor No.12 | Reactor No.13 | Reactor No.14 | Reactor No.15 | Reactor No.16 | Reactor No.17 | Reactor No.18 |
|------------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 0 | 30,9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 30,8 | 195 | 258 | 250 | 203 | 220 | 218 | 218 | 205 | 170 | 250 | 190 | 238 | 175 | 225 | 243 | 203 | 198 | 163 |
| 14 | 29 | 128 | 145 | 160 | 175 | 193 | 268 | 183 | 190 | 153 | 200 | 255 | 230 | 160 | 203 | 215 | 118 | 188 | 118 |
| 17 | 31 | 157 | 170 | 182 | 130 | 202 | 275 | 162 | 162 | 135 | 185 | 277 | 237 | 167 | 212 | 217 | 120 | 192 | 122 |
| 20 | 33,2 | 215 | 227 | 245 | 180 | 270 | 307 | 202 | 207 | 172 | 232 | 297 | 292 | 225 | 287 | 245 | 162 | 227 | 162 |
| 23 | 32,1 | 200 | 205 | 227 | 212 | 287 | 305 | 185 | 185 | 150 | 225 | 235 | 287 | 235 | 282 | 252 | 157 | 210 | 150 |
| 39 | 29,8 | 378 | 238 | 370 | 498 | 585 | 393 | 118 | 370 | 283 | 135 | 305 | 565 | 188 | 513 | 143 | 190 | 183 | 145 |
| 42 | 32,3 | 520 | 387 | 480 | 637 | 710 | 497 | 215 | 512 | 430 | 187 | 412 | 637 | 277 | 662 | 185 | 252 | 240 | 202 |
| 42 | 32,3 | 520 | 387 | 480 | 637 | 710 | 497 | 215 | 512 | 430 | 187 | 412 | 637 | 277 | 662 | 185 | 342 | 337 | 252 |
| 45 | 33,6 | 653 | 520 | 605 | 775 | 843 | 655 | 360 | 645 | 583 | 270 | 485 | 740 | 430 | 795 | 273 | 400 | 405 | 285 |
| 46 | 33,9 | 701 | 558 | 645 | 821 | 896 | 713 | 438 | 708 | 655 | 293 | 525 | 778 | 525 | 861 | 313 | 400 | 405 | 285 |
| 64 | 30,5 | 731 | 487 | 589 | 786 | 999 | 737 | 599 | 899 | 699 | 317 | 499 | 711 | 672 | 889 | 549 | 621 | 493 | 611 |
| 66 | 32,2 | 792 | 547 | 645 | 847 | 1052 | 780 | 662 | 1010 | 765 | 375 | 555 | 752 | 720 | 937 | 622 | 694 | 539 | 701 |
| 69 | 34,2 | 848 | 611 | 686 | 931 | 1118 | 826 | 750 | 1086 | 853 | 443 | 616 | 801 | 783 | 966 | 740 | 790 | 592 | 807 |
| 87 | 30,3 | 581 | 434 | 466 | 756 | 889 | 661 | 627 | 914 | 782 | 447 | 514 | 591 | 569 | 681 | 682 | 863 | 578 | 913 |
| 91 | 33,3 | 663 | 520 | 570 | 858 | 978 | 738 | 725 | 995 | 880 | 563 | 593 | 663 | 630 | 745 | 770 | 949 | 682 | 994 |
| 93 | 34,5 | 681 | 566 | 598 | 886 | 1016 | 801 | 753 | 1016 | 906 | 608 | 626 | 686 | 666 | 773 | 798 | 972 | 755 | 1010 |
| 93 | 34,5 | 681 | 566 | 598 | 886 | 1016 | 801 | 753 | 1016 | 906 | 608 | 626 | 686 | 666 | 773 | 798 | 972 | 755 | 1010 |
| 95 | 33,9 | 708 | 610 | 640 | 928 | 1058 | 855 | 795 | 1052 | 950 | 660 | 658 | 713 | 692 | 800 | 835 | 992 | 789 | 1007 |
| 112 | 30,8 | 434 | 427 | 477 | 674 | 761 | 697 | 632 | 761 | 692 | 539 | 567 | 579 | 545 | 649 | 667 | 796 | 781 | 643 |
| 114 | 32,3 | 486 | 489 | 531 | 733 | 813 | 741 | 676 | 806 | 721 | 591 | 608 | 621 | 601 | 633 | 696 | 817 | 845 | 682 |
| 117 | 33,2 | 512 | 524 | 572 | 764 | 839 | 772 | 704 | 822 | 727 | 627 | 632 | 637 | 624 | 634 | 704 | 811 | 884 | 671 |
| 120 | 32,5 | 501 | 521 | 561 | 756 | 823 | 769 | 681 | 801 | 696 | 621 | 654 | 646 | 626 | 646 | 706 | 798 | 878 | 678 |
| 136 | 30,9 | 414 | 447 | 489 | 624 | 667 | 669 | 552 | 659 | 544 | 562 | 600 | 567 | 580 | 549 | 584 | 633 | 744 | 571 |
| 138 | 32,8 | 464 | 507 | 544 | 669 | 704 | 714 | 586 | 689 | 586 | 604 | 644 | 609 | 626 | 579 | 619 | 665 | 773 | 608 |
| 141 | 33,3 | 500 | 537 | 582 | 687 | 729 | 742 | 619 | 712 | 622 | 629 | 689 | 645 | 674 | 614 | 649 | 684 | 794 | 641 |
| 142 | 33,3 | 500 | 537 | 582 | 687 | 729 | 742 | 619 | 712 | 622 | 629 | 689 | 645 | 674 | 614 | 649 | 684 | 794 | 641 |
| 144 | 32,8 | 514 | 554 | 599 | 706 | 744 | 754 | 639 | 731 | 639 | 664 | 709 | 664 | 716 | 646 | 676 | 705 | 818 | 665 |
| 160 | 31,4 | 459 | 497 | 544 | 616 | 659 | 679 | 564 | 631 | 574 | 614 | 681 | 634 | 696 | 589 | 604 | 618 | 753 | 605 |
| 163 | 33,2 | 512 | 549 | 604 | 667 | 714 | 729 | 622 | 684 | 637 | 674 | 744 | 697 | 762 | 649 | 664 | 678 | 801 | 666 |
| 166 | 33,1 | 532 | 572 | 627 | 687 | 734 | 744 | 634 | 701 | 647 | 689 | 777 | 714 | 782 | 667 | 669 | 673 | 831 | 668 |
| 184 | 30,2 | 442 | 467 | 527 | 564 | 619 | 604 | 515 | 584 | 539 | 577 | 697 | 589 | 710 | 584 | 582 | 583 | 666 | 588 |
| 188 | 33,5 | 547 | 592 | 645 | 672 | 730 | 710 | 620 | 690 | 652 | 680 | 817 | 732 | 810 | 690 | 707 | 681 | 754 | 689 |
| 191 | 33,9 | 565 | 605 | 655 | 698 | 753 | 733 | 648 | 710 | 675 | 715 | 853 | 758 | 835 | 713 | 735 | 705 | 787 | 710 |
| 208 | 30,9 | 463 | 491 | 541 | 585 | 625 | 608 | 516 | 593 | 558 | 593 | 781 | 638 | 758 | 603 | 616 | 602 | 690 | 615 |
| 212 | 33,5 | 557 | 602 | 652 | 682 | 722 | 690 | 607 | 680 | 660 | 712 | 897 | 740 | 860 | 700 | 722 | 696 | 769 | 709 |
| 214 | 34,2 | 568 | 608 | 658 | 691 | 733 | 706 | 611 | 698 | 661 | 718 | 908 | 744 | 868 | 706 | 728 | 705 | 785 | 710 |
| 214,12 | 34,2 | 568 | 608 | 658 | 691 | 733 | 706 | 611 | 698 | 661 | 718 | 908 | 744 | 868 | 706 | 728 | 705 | 785 | 710 |
| 232,45 | 31,2 | 481 | 511 | 582 | 627 | 633 | 594 | 516 | 598 | 585 | 644 | 905 | 636 | 877 | 621 | 674 | 653 | 671 | 623 |
| 236 | 32,5 | 531 | 578 | 640 | 685 | 696 | 656 | 578 | 653 | 632 | 701 | 962 | 686 | 935 | 668 | 722 | 699 | 721 | 647 |
| 280 | 29,3 | 478 | 503 | 618 | 605 | 585 | 543 | 473 | 577 | 588 | 683 | 1001 | 638 | 1043 | 580 | 655 | 629 | 647 | 579 |
| 284 | 32,4 | 553 | 618 | 625 | 690 | 688 | 633 | 550 | 655 | 652 | 808 | 1142 | 713 | 1157 | 655 | 732 | 681 | 686 | 672 |

ALGORITMO MATEMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CURVAS DE PRODUCCIÓN ACUMULADA DE BIOGÁS A PARTIR DE LAS PRESIONES TOTALES DE BIOGÁS

Deltas de presión de Biogás (Δp). Para la determinación de los Δp se empleó la Ecuación A2.1. La cual tiene en cuenta las presiones de biogás que se registraron a lo largo del experimento.

$$\Delta p_i = p_i - p_{i-1} \quad \text{Ecuación A2.1}$$

Dónde:

Δp_i = Delta de presión (mbar) correspondiente a la i-esima posición

p_i = Presión de biogás (mbar) correspondiente a la i-esima posición

p_{i-1} = Presión de biogás (mbar) anterior a la i-esima posición

Concentración de Biogás en el Headspace de RA en condiciones experimentales. Teniendo en cuenta los valores individuales de Δp se empleó la Ecuación A2.2 para determinar la concentración de biogás en el Headspace de los RA.

$$C_i = \frac{(\Delta p_i) * 9,67 * 10^{-4}}{R * (T_i + 273,15)} \quad \text{Ecuación A2.2}$$

Dónde:

C_i = Concentración de biogás (mol.L⁻¹) correspondiente a la i-esima posición

R = Constante universal de los gases (0,08205 L.atm.K⁻¹.mol⁻¹)

T_i = Temperatura ambiente (°C) correspondiente a la i-esima posición

Moles de Biogás en el Headspace de RA en condiciones experimentales (CE). Con los valores individuales de la concentración de biogás y la Ecuación A2.3 se determinó el número de moles de biogás almacenados en el Headspace de RA.

$$n_i = V_{\text{Headspace}} * C_i \quad \text{Ecuación A2.3}$$

Dónde:

n_i = Moles de biogás (mol) correspondiente a la i-esima posición

$V_{\text{Headspace}}$ = Volumen del Headspace (0,250 L) de RA

Volumen de Biogás en el Headspace de RA en condiciones normales (CN). Con los valores individuales de las moles de biogás y la Ecuación A2.4 se determinó el volumen de biogás en condiciones normales de presión (1 atm) y temperatura (273,15 °K).

$$V_i = \frac{n_i * R * T}{P} \quad \text{Ecuación A2.4}$$

Dónde:

$V_i(\text{Biogas})$ = Volumen de biogás (L) en condiciones normales, correspondiente a la i-esima posición

T = Temperatura en condiciones normales (273,15 °K)

P = Presión en condiciones normales (1 atm)

Volumen acumulado de Biogás en el Headspace de RA en condiciones normales (CN). Con los valores individuales del volumen de biogás en CN y la Ecuación A2.5 se calculó el volumen acumulado.

$$V_{\text{Acumulado}_i} = V_i + V_{i-1} \quad \text{Ecuación A2.5}$$

Dónde:

$V_{\text{Acumulado}_i}$ = Volumen acumulado de biogás (L) en condiciones normales, correspondiente a la i-esima posición

V_i = Volumen de Biogás (L) correspondiente a la i-esima posición

V_{i-1} = Volumen de Biogás (L) anterior a la i-esima posición

Tabla A2.2. Datos de volumen acumulado de biogás en reactores acidogénicos con agua residual agroindustrial

| Tiempo (hora) | Reactor No.1 | Reactor No.2 | Reactor No.3 | Reactor No.4 | Reactor No.5 | Reactor No.6 | Reactor No.7 | Reactor No.8 | Reactor No.9 | Reactor No.10 | Reactor No.11 | Reactor No.12 | Reactor No.13 | Reactor No.14 | Reactor No.15 | Reactor No.16 | Reactor No.17 | Reactor No.18 |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 42,38 | 55,96 | 54,33 | 44,01 | 47,81 | 47,26 | 47,27 | 44,55 | 36,94 | 54,33 | 41,29 | 51,61 | 38,03 | 48,89 | 52,70 | 44,00 | 42,92 | 35,31 |
| 14 | 42,38 | 55,96 | 54,33 | 44,01 | 47,81 | 58,26 | 47,27 | 44,55 | 36,94 | 54,33 | 55,56 | 51,61 | 38,03 | 48,89 | 52,70 | 44,00 | 42,92 | 35,31 |
| 17 | 48,83 | 61,33 | 59,14 | 44,01 | 49,92 | 59,82 | 47,27 | 44,55 | 36,94 | 54,33 | 60,38 | 53,17 | 39,59 | 51,00 | 53,18 | 44,49 | 43,95 | 36,35 |
| 20 | 61,17 | 73,66 | 72,55 | 54,71 | 64,40 | 66,75 | 55,81 | 54,18 | 44,95 | 64,49 | 64,62 | 64,96 | 51,92 | 67,10 | 59,03 | 53,60 | 51,44 | 44,92 |
| 23 | 61,17 | 73,66 | 72,55 | 61,78 | 68,22 | 66,75 | 55,81 | 54,18 | 44,95 | 64,49 | 64,62 | 64,96 | 54,12 | 67,10 | 60,69 | 53,60 | 51,44 | 44,92 |
| 39 | 99,93 | 80,81 | 103,69 | 123,99 | 133,15 | 85,90 | 55,81 | 94,59 | 73,92 | 64,49 | 79,95 | 125,53 | 54,12 | 117,32 | 60,69 | 60,75 | 51,44 | 44,92 |
| 42 | 130,67 | 113,18 | 127,39 | 154,18 | 160,10 | 108,52 | 76,80 | 125,31 | 105,73 | 75,76 | 103,12 | 141,13 | 73,50 | 149,67 | 69,80 | 74,19 | 63,82 | 57,29 |
| 42 | 130,67 | 113,18 | 127,39 | 154,18 | 160,10 | 108,52 | 76,80 | 125,31 | 105,73 | 75,76 | 103,12 | 141,13 | 73,50 | 149,67 | 69,80 | 93,54 | 84,78 | 68,02 |
| 45 | 159,33 | 141,83 | 154,42 | 183,92 | 188,76 | 142,55 | 108,11 | 153,96 | 138,67 | 93,63 | 118,84 | 163,34 | 106,43 | 178,33 | 88,74 | 105,90 | 99,29 | 75,00 |
| 46 | 169,58 | 149,92 | 163,05 | 193,63 | 200,08 | 154,95 | 124,80 | 167,42 | 154,29 | 98,50 | 127,47 | 171,44 | 126,88 | 192,34 | 97,37 | 105,90 | 99,29 | 75,00 |
| 64 | 176,30 | 149,92 | 163,05 | 193,63 | 222,57 | 160,07 | 159,90 | 209,00 | 163,80 | 103,65 | 127,47 | 171,44 | 158,72 | 198,52 | 148,76 | 153,96 | 118,53 | 145,93 |
| 66 | 189,45 | 163,06 | 175,11 | 206,78 | 234,10 | 169,42 | 173,54 | 232,94 | 177,99 | 116,23 | 139,51 | 180,28 | 169,12 | 208,97 | 164,58 | 169,80 | 128,43 | 165,55 |
| 69 | 201,47 | 176,67 | 183,89 | 224,71 | 248,27 | 179,27 | 192,48 | 249,23 | 196,96 | 130,90 | 152,58 | 190,70 | 182,69 | 215,08 | 189,98 | 190,41 | 139,90 | 188,29 |
| 87 | 201,47 | 176,67 | 183,89 | 224,71 | 248,27 | 179,27 | 192,48 | 249,23 | 196,96 | 131,66 | 152,58 | 190,70 | 182,69 | 215,08 | 189,98 | 206,35 | 139,90 | 211,33 |
| 91 | 219,01 | 195,27 | 206,25 | 246,57 | 267,44 | 195,71 | 213,71 | 266,73 | 218,21 | 156,69 | 169,54 | 206,12 | 195,84 | 228,86 | 209,07 | 224,97 | 162,28 | 228,85 |
| 93 | 222,89 | 205,05 | 212,26 | 252,60 | 275,61 | 209,24 | 219,70 | 271,12 | 223,68 | 166,45 | 176,62 | 211,08 | 203,44 | 234,88 | 215,07 | 229,91 | 177,96 | 232,18 |
| 93 | 222,89 | 205,05 | 212,26 | 252,60 | 275,61 | 209,24 | 219,70 | 271,12 | 223,68 | 166,45 | 176,62 | 211,08 | 203,44 | 234,88 | 215,07 | 229,91 | 177,96 | 232,18 |
| 95 | 228,67 | 214,59 | 221,27 | 261,59 | 284,60 | 220,93 | 228,71 | 279,04 | 233,22 | 177,62 | 183,48 | 216,85 | 209,23 | 240,65 | 223,00 | 234,07 | 185,36 | 232,18 |
| 112 | 228,67 | 214,59 | 221,27 | 261,59 | 284,60 | 220,93 | 228,71 | 279,04 | 233,22 | 177,62 | 183,48 | 216,85 | 209,23 | 240,65 | 223,00 | 234,07 | 185,36 | 232,18 |
| 114 | 239,83 | 227,90 | 232,96 | 274,40 | 295,79 | 230,47 | 238,22 | 288,61 | 239,51 | 188,75 | 192,46 | 225,87 | 221,43 | 240,65 | 229,28 | 238,77 | 199,21 | 240,66 |
| 117 | 245,42 | 235,64 | 241,79 | 281,09 | 301,41 | 237,14 | 244,33 | 292,07 | 240,80 | 196,49 | 197,50 | 229,32 | 226,47 | 240,87 | 231,10 | 238,77 | 207,50 | 240,66 |
| 120 | 245,42 | 235,64 | 241,79 | 281,09 | 301,41 | 237,14 | 244,33 | 292,07 | 240,80 | 196,49 | 202,21 | 231,31 | 226,86 | 243,40 | 231,48 | 238,77 | 207,50 | 242,10 |
| 136 | 245,42 | 235,64 | 241,79 | 281,09 | 301,41 | 237,14 | 244,33 | 292,07 | 240,80 | 196,49 | 202,21 | 231,31 | 226,86 | 243,40 | 231,48 | 238,77 | 207,50 | 242,10 |
| 138 | 256,12 | 248,48 | 253,55 | 290,73 | 309,45 | 246,75 | 251,74 | 298,49 | 249,87 | 205,53 | 211,80 | 240,42 | 236,97 | 249,80 | 238,92 | 245,72 | 213,87 | 250,13 |
| 141 | 263,78 | 255,05 | 261,74 | 294,63 | 314,97 | 252,80 | 258,85 | 303,47 | 257,53 | 211,03 | 221,61 | 248,08 | 247,31 | 257,47 | 245,49 | 249,62 | 218,30 | 257,26 |
| 142 | 263,78 | 255,05 | 261,74 | 294,63 | 314,97 | 252,80 | 258,85 | 303,47 | 257,53 | 211,03 | 221,61 | 248,08 | 247,31 | 257,47 | 245,49 | 249,62 | 218,30 | 257,26 |
| 144 | 266,85 | 258,67 | 265,35 | 298,76 | 318,02 | 255,32 | 263,00 | 307,60 | 261,13 | 218,42 | 225,76 | 252,22 | 256,32 | 264,30 | 251,26 | 254,29 | 223,51 | 262,47 |
| 160 | 266,85 | 258,67 | 265,35 | 298,76 | 318,02 | 255,32 | 263,00 | 307,60 | 261,13 | 218,42 | 225,76 | 252,22 | 256,32 | 264,30 | 251,26 | 254,29 | 223,51 | 262,47 |
| 163 | 278,24 | 270,04 | 278,36 | 309,67 | 330,01 | 266,19 | 275,45 | 319,05 | 274,69 | 231,40 | 239,30 | 265,82 | 270,39 | 277,35 | 264,27 | 267,35 | 233,86 | 275,52 |
| 166 | 282,52 | 274,86 | 283,18 | 313,94 | 334,29 | 269,39 | 278,11 | 322,79 | 276,82 | 234,61 | 246,28 | 269,56 | 274,67 | 281,09 | 265,31 | 267,35 | 240,29 | 276,02 |
| 184 | 282,52 | 274,86 | 283,18 | 313,94 | 334,29 | 269,39 | 278,11 | 322,79 | 276,82 | 234,61 | 246,28 | 269,56 | 274,67 | 281,09 | 265,31 | 267,35 | 240,29 | 276,02 |
| 188 | 305,18 | 301,80 | 308,52 | 337,23 | 358,14 | 292,09 | 300,72 | 345,56 | 301,11 | 256,68 | 272,16 | 300,39 | 296,22 | 303,82 | 292,29 | 288,49 | 259,24 | 297,68 |
| 191 | 309,08 | 304,62 | 310,81 | 342,76 | 363,13 | 297,07 | 306,76 | 350,01 | 306,09 | 264,34 | 279,82 | 305,92 | 301,73 | 308,80 | 298,34 | 293,48 | 266,38 | 302,12 |
| 208 | 309,08 | 304,62 | 310,81 | 342,76 | 363,13 | 297,07 | 306,76 | 350,01 | 306,09 | 264,34 | 279,82 | 305,92 | 301,73 | 308,80 | 298,34 | 293,48 | 266,38 | 302,12 |
| 212 | 329,35 | 328,64 | 334,84 | 363,64 | 384,02 | 314,67 | 326,45 | 368,75 | 328,00 | 289,96 | 304,93 | 327,88 | 323,58 | 329,67 | 321,31 | 313,83 | 283,46 | 322,44 |
| 214 | 331,74 | 329,95 | 336,16 | 365,51 | 386,43 | 318,14 | 327,22 | 372,78 | 328,24 | 291,26 | 307,31 | 328,68 | 325,43 | 330,99 | 322,62 | 315,70 | 286,93 | 322,70 |
| 214,12 | 331,74 | 329,95 | 336,16 | 365,51 | 386,43 | 318,14 | 327,22 | 372,78 | 328,24 | 291,26 | 307,31 | 328,68 | 325,43 | 330,99 | 322,62 | 315,70 | 286,93 | 322,70 |
| 232,45 | 331,74 | 329,95 | 336,16 | 365,51 | 386,43 | 318,14 | 327,22 | 372,78 | 328,24 | 291,26 | 307,31 | 328,68 | 327,29 | 330,99 | 322,62 | 315,70 | 286,93 | 322,70 |
| 236 | 342,45 | 344,42 | 348,61 | 378,01 | 399,88 | 331,56 | 340,60 | 384,61 | 338,54 | 303,57 | 319,79 | 339,43 | 339,77 | 341,19 | 332,94 | 325,51 | 297,82 | 328,03 |
| 280 | 342,45 | 344,42 | 348,61 | 378,01 | 399,88 | 331,56 | 340,60 | 384,61 | 338,54 | 303,57 | 328,14 | 339,43 | 363,39 | 341,19 | 332,94 | 325,51 | 297,82 | 328,03 |
| 284 | 358,64 | 369,23 | 349,98 | 396,23 | 422,12 | 351,03 | 357,29 | 401,44 | 362,36 | 330,53 | 358,73 | 355,71 | 388,06 | 357,45 | 349,48 | 336,73 | 306,32 | 348,07 |

Tabla A2.3.Datos de volumen acumulado de biogás en reactores acidogénicos con agua destilada (Blancos)

| Tiempo (hora) | Reactor No.19 | Reactor No.20 | Reactor No.21 | Reactor No.22 | Reactor No.23 | Reactor No.24 | Reactor No.25 | Reactor No.26 | Reactor No.27 | Reactor No.28 | Reactor No.29 | Reactor No.30 |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 0 | 0 | 3,26 | 7,61 | 9,78 | 12,49 | 3,26 | 8,69 | 5,98 | 5,43 | 3,80 | 8,15 |
| 14 | 0 | 0 | 3,26 | 7,61 | 9,78 | 12,49 | 3,26 | 8,69 | 5,98 | 5,43 | 3,80 | 8,15 |
| 17 | 0 | 1,09 | 5,97 | 10,32 | 9,78 | 14,12 | 3,26 | 8,69 | 9,78 | 9,23 | 8,69 | 13,03 |
| 20 | 4,85 | 9,71 | 12,98 | 16,25 | 15,17 | 21,13 | 10,27 | 12,46 | 14,63 | 16,78 | 12,46 | 19,50 |
| 23 | 4,85 | 9,71 | 12,98 | 16,25 | 15,17 | 21,13 | 10,27 | 12,46 | 14,63 | 16,78 | 12,46 | 19,50 |
| 39 | 4,85 | 9,71 | 12,98 | 16,25 | 15,17 | 21,13 | 10,27 | 12,46 | 14,63 | 16,78 | 12,46 | 19,50 |
| 42 | 12,42 | 17,28 | 20,55 | 23,28 | 18,95 | 26,54 | 16,75 | 18,95 | 18,95 | 20,56 | 17,33 | 25,45 |
| 42 | 12,42 | 17,28 | 20,55 | 23,28 | 18,95 | 26,54 | 16,75 | 18,95 | 18,95 | 20,56 | 17,33 | 25,45 |
| 45 | 20,49 | 25,89 | 27,01 | 30,27 | 27,03 | 34,07 | 23,75 | 26,49 | 25,95 | 29,17 | 22,17 | 32,45 |
| 46 | 24,26 | 29,65 | 29,70 | 35,11 | 29,71 | 36,76 | 25,90 | 28,64 | 28,64 | 30,79 | 27,01 | 34,60 |
| 64 | 24,26 | 29,65 | 29,70 | 35,11 | 29,71 | 36,76 | 25,90 | 28,64 | 28,64 | 30,79 | 27,01 | 34,60 |
| 66 | 30,21 | 37,22 | 37,81 | 42,68 | 36,74 | 44,87 | 33,47 | 37,83 | 35,13 | 37,28 | 33,50 | 42,71 |
| 69 | 39,34 | 46,89 | 45,33 | 51,28 | 44,27 | 51,86 | 40,99 | 47,50 | 40,50 | 44,80 | 39,41 | 50,77 |
| 87 | 39,34 | 46,89 | 45,33 | 51,28 | 44,27 | 51,86 | 40,99 | 47,50 | 40,50 | 44,80 | 39,41 | 50,77 |
| 91 | 50,11 | 59,29 | 57,18 | 61,52 | 55,04 | 63,17 | 51,77 | 59,35 | 49,12 | 54,50 | 49,11 | 62,62 |
| 93 | 55,48 | 63,58 | 63,09 | 71,18 | 62,02 | 68,54 | 59,82 | 65,80 | 50,73 | 58,79 | 53,40 | 67,45 |
| 93 | 55,48 | 63,58 | 63,09 | 71,18 | 62,02 | 68,54 | 59,82 | 65,80 | 50,73 | 58,79 | 53,40 | 67,45 |
| 95 | 55,48 | 63,58 | 63,09 | 71,18 | 62,02 | 68,54 | 59,82 | 65,80 | 50,73 | 58,79 | 53,40 | 67,45 |
| 112 | 55,48 | 63,58 | 63,09 | 71,18 | 62,02 | 68,54 | 59,82 | 65,80 | 50,73 | 58,79 | 53,40 | 67,45 |
| 114 | 60,35 | 68,45 | 68,49 | 75,50 | 67,42 | 73,94 | 64,14 | 71,20 | 59,92 | 63,11 | 58,81 | 73,94 |
| 117 | 61,42 | 68,45 | 70,65 | 76,04 | 69,58 | 75,02 | 67,38 | 73,90 | 59,92 | 69,04 | 63,66 | 78,79 |
| 120 | 65,75 | 72,23 | 73,89 | 80,36 | 73,90 | 80,42 | 70,62 | 77,68 | 62,62 | 69,04 | 63,66 | 78,79 |
| 136 | 65,75 | 72,23 | 73,89 | 80,36 | 73,90 | 80,42 | 70,62 | 77,68 | 62,62 | 69,04 | 63,66 | 78,79 |
| 138 | 73,30 | 78,70 | 81,44 | 85,76 | 82,54 | 87,44 | 78,71 | 85,23 | 70,18 | 74,98 | 67,98 | 82,57 |
| 141 | 79,23 | 83,01 | 86,83 | 90,61 | 88,46 | 92,83 | 84,10 | 90,62 | 71,79 | 77,67 | 71,75 | 86,34 |
| 142 | 79,23 | 83,01 | 86,83 | 90,61 | 88,46 | 92,83 | 84,10 | 90,62 | 71,79 | 77,67 | 71,75 | 86,34 |
| 144 | 79,23 | 83,01 | 86,83 | 90,61 | 88,46 | 92,83 | 84,10 | 90,62 | 71,79 | 77,67 | 71,75 | 86,34 |
| 160 | 79,23 | 83,01 | 86,83 | 90,61 | 88,46 | 92,83 | 84,10 | 90,62 | 71,79 | 77,67 | 71,75 | 86,34 |
| 163 | 88,39 | 91,10 | 97,07 | 99,23 | 97,63 | 103,07 | 92,73 | 99,24 | 80,95 | 85,22 | 78,75 | 94,42 |
| 166 | 88,39 | 91,10 | 97,07 | 99,23 | 97,63 | 103,07 | 92,73 | 100,32 | 80,95 | 85,22 | 78,75 | 94,42 |
| 184 | 88,39 | 91,10 | 97,07 | 99,23 | 97,63 | 103,07 | 92,73 | 100,32 | 80,95 | 85,22 | 78,75 | 94,42 |
| 188 | 105,62 | 105,10 | 112,69 | 113,23 | 114,86 | 119,22 | 106,73 | 115,40 | 96,03 | 98,68 | 90,60 | 106,27 |
| 191 | 108,85 | 108,32 | 116,45 | 117,00 | 119,70 | 124,60 | 109,95 | 119,16 | 100,33 | 101,91 | 93,83 | 110,03 |
| 208 | 108,85 | 108,32 | 116,45 | 117,00 | 119,70 | 124,60 | 109,95 | 119,16 | 100,33 | 101,91 | 93,83 | 110,03 |
| 212 | 122,31 | 119,09 | 128,84 | 127,23 | 132,62 | 137,52 | 120,72 | 131,01 | 112,18 | 112,14 | 104,06 | 119,72 |
| 214 | 126,07 | 123,39 | 132,06 | 130,45 | 137,99 | 141,28 | 123,41 | 135,31 | 115,40 | 115,36 | 106,21 | 121,34 |
| 214,12 | 126,07 | 123,39 | 132,06 | 130,45 | 137,99 | 141,28 | 123,41 | 135,31 | 115,40 | 115,36 | 106,21 | 121,34 |
| 232,45 | 126,07 | 123,39 | 132,06 | 130,45 | 137,99 | 141,28 | 123,41 | 135,31 | 115,40 | 115,36 | 106,21 | 121,34 |
| 236 | 137,53 | 131,49 | 141,37 | 139,22 | 147,30 | 150,05 | 134,87 | 147,19 | 122,97 | 123,46 | 113,23 | 128,36 |
| 280 | 137,53 | 131,49 | 141,37 | 139,22 | 147,30 | 150,83 | 134,87 | 147,19 | 122,97 | 123,46 | 113,23 | 128,36 |
| 284 | 145,92 | 140,68 | 150,30 | 148,70 | 156,80 | 155,45 | 144,34 | 158,00 | 132,15 | 132,65 | 122,96 | 139,17 |

ANEXO 3

Caracterización Fisicoquímica del Sobrenadante

Tabla A3.1. Condiciones Iniciales del experimento

| Tipo de Pre-tratamiento | Reactor No. | Sustrato | Características del Inoculo | | | | pH del lodo al final del pretratamiento | pH del lodo antes de iniciar ensayo | pH del AR antes de iniciar ensayo | pH del AR y del Lodo Pre-tratado | pH de ajuste ideal | pH de ajuste real | Bicarbonato 4% Adicionado |
|-------------------------|-------------|-------------|-----------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|-------|-----------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------|-------------------|---------------------------|
| | | | Tipo | Sólidos Totales (g.L ⁻¹) | Sólidos Volátiles (g.L ⁻¹) | SV/ST | Unidades | Unidades | Unidades | Unidades | Unidades | Unidades | mL |
| Químico | 1 | A.Residual | Metanogenico | 50,53 | 36,87 | 0,73 | 6,02 | 5,90 | 3,70 | 3,86 | 5,70 | 5,70 | 12,50 |
| Químico | 2 | A.Residual | Metanogenico | 50,53 | 36,87 | 0,73 | 6,02 | 5,90 | 3,70 | 3,87 | 5,70 | 5,69 | 13,00 |
| Químico | 3 | A.Residual | Metanogenico | 50,53 | 36,87 | 0,73 | 6,02 | 5,90 | 3,70 | 3,85 | 5,70 | 5,69 | 13,00 |
| Químico | 4 | A.Residual | Metanogenico | 50,53 | 36,87 | 0,73 | 6,02 | 5,90 | 3,70 | 3,86 | 5,40 | 5,40 | 11,00 |
| Químico | 5 | A.Residual | Metanogenico | 50,53 | 36,87 | 0,73 | 6,02 | 5,90 | 3,70 | 3,86 | 5,40 | 5,39 | 11,00 |
| Químico | 6 | A.Residual | Metanogenico | 50,53 | 36,87 | 0,73 | 6,02 | 5,90 | 3,70 | 3,86 | 5,40 | 5,41 | 11,20 |
| Químico | 7 | A.Residual | Metanogenico | 50,53 | 36,87 | 0,73 | 6,02 | 5,90 | 3,70 | 3,86 | 5,00 | 5,00 | 9,10 |
| Químico | 8 | A.Residual | Metanogenico | 50,53 | 36,87 | 0,73 | 6,02 | 5,90 | 3,70 | 3,86 | 5,00 | 5,01 | 9,00 |
| Químico | 9 | A.Residual | Metanogenico | 50,53 | 36,87 | 0,73 | 6,02 | 5,90 | 3,70 | 3,86 | 5,00 | 5,00 | 8,90 |
| Termico | 10 | A.Residual | Metanogenico | 52,93 | 39,60 | 0,75 | 7,48 | 7,48 | 3,70 | 4,28 | 5,70 | 5,69 | 10,70 |
| Termico | 11 | A.Residual | Metanogenico | 52,93 | 39,60 | 0,75 | 7,48 | 7,48 | 3,70 | 4,29 | 5,70 | 5,70 | 10,40 |
| Termico | 12 | A.Residual | Metanogenico | 52,93 | 39,60 | 0,75 | 7,48 | 7,48 | 3,70 | 4,29 | 5,70 | 5,70 | 10,80 |
| Termico | 13 | A.Residual | Metanogenico | 52,93 | 39,60 | 0,75 | 7,48 | 7,48 | 3,70 | 4,29 | 5,40 | 5,41 | 8,60 |
| Termico | 14 | A.Residual | Metanogenico | 52,93 | 39,60 | 0,75 | 7,48 | 7,48 | 3,70 | 4,29 | 5,40 | 5,40 | 8,70 |
| Termico | 15 | A.Residual | Metanogenico | 52,93 | 39,60 | 0,75 | 7,48 | 7,48 | 3,70 | 4,28 | 5,40 | 5,40 | 8,70 |
| Termico | 16 | A.Residual | Metanogenico | 52,93 | 39,60 | 0,75 | 7,48 | 7,48 | 3,70 | 4,28 | 5,00 | 5,00 | 6,50 |
| Termico | 17 | A.Residual | Metanogenico | 52,93 | 39,60 | 0,75 | 7,48 | 7,48 | 3,70 | 4,29 | 5,00 | 5,00 | 6,50 |
| Termico | 18 | A.Residual | Metanogenico | 52,93 | 39,60 | 0,75 | 7,48 | 7,48 | 3,70 | 4,29 | 5,00 | 5,00 | 6,50 |
| | | | | | | | | | | | | | HCL 1,0 N |
| Químico | 19 | A.Destilada | Metanogenico | 50,53 | 36,87 | 0,73 | 6,02 | 5,90 | - | 6,48 | 5,70 | 5,68 | 0,25 |
| Químico | 20 | A.Destilada | Metanogenico | 50,53 | 36,87 | 0,73 | 6,02 | 5,90 | - | 6,55 | 5,40 | 5,39 | 0,30 |
| Químico | 21 | A.Destilada | Metanogenico | 50,53 | 36,87 | 0,73 | 6,02 | 5,90 | - | 6,57 | 5,00 | 5,06 | 0,40 |
| Termico | 22 | A.Destilada | Metanogenico | 52,93 | 39,60 | 0,75 | 7,48 | 7,48 | - | 7,85 | 5,70 | 5,73 | 1,00 |
| Termico | 23 | A.Destilada | Metanogenico | 52,93 | 39,60 | 0,75 | 7,48 | 7,48 | - | 7,84 | 5,40 | 5,39 | 1,30 |
| Termico | 24 | A.Destilada | Metanogenico | 52,93 | 39,60 | 0,75 | 7,48 | 7,48 | - | 7,82 | 5,00 | 5,00 | 1,55 |
| Químico | 25 | A.Destilada | Metanogenico | 50,53 | 36,87 | 0,73 | 6,02 | 5,90 | - | 6,52 | 5,40 | 5,39 | 0,30 |
| Termico | 26 | A.Destilada | Metanogenico | 52,93 | 39,60 | 0,75 | 7,48 | 7,48 | - | 7,85 | 5,40 | 5,40 | 1,30 |
| Químico | 27 | A.Destilada | Metanogenico | 50,53 | 36,87 | 0,73 | 6,02 | 5,90 | - | 6,57 | 5,70 | 5,68 | 0,25 |
| Termico | 28 | A.Destilada | Metanogenico | 52,93 | 39,60 | 0,75 | 7,48 | 7,48 | - | 7,86 | 5,70 | 5,71 | 1,09 |
| Químico | 29 | A.Destilada | Metanogenico | 50,53 | 36,87 | 0,73 | 6,02 | 5,90 | - | 6,54 | 5,00 | 4,99 | 0,40 |
| Termico | 30 | A.Destilada | Metanogenico | 52,93 | 39,60 | 0,75 | 7,48 | 7,48 | - | 7,81 | 5,00 | 4,99 | 1,59 |

Tabla A3.2.Caracterización fisicoquímica del sobrenadante (final) en reactores acidogénicos

| Reactor No | pH (Unidades) | | Alcalinidad (mg CaCO ₃ .L ⁻¹) | | | | DQO _{Total} (mg O ₂ .L ⁻¹) | AGVs _{Totales} (mg A.acetico.L ⁻¹) | Carbohidratos _{Totales} (mg Glucosa.L ⁻¹) |
|------------|---------------|-------|------------------------------------------------------|--------|---------|---------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| | | | Bicarbonatica | | Total | | | | |
| | Inicial | Final | Inicial | Final | Inicial | Final | Final | Final | Final |
| 1 | 5,70 | 6,11 | 472,74 | 401,63 | 862,45 | 981,66 | 2746,67 | 1480,66 | 23,82 |
| 2 | 5,69 | 6,04 | 587,43 | 358,05 | 907,66 | 977,96 | 2688,33 | 1602,35 | 21,29 |
| 3 | 5,69 | 5,99 | 480,55 | 305,84 | 888,75 | 962,75 | 2521,67 | 1764,62 | 26,58 |
| 4 | 5,40 | 5,95 | 397,51 | 285,70 | 711,17 | 878,89 | 2830,00 | 1615,88 | 28,85 |
| 5 | 5,39 | 5,99 | 410,26 | 313,65 | 709,11 | 884,64 | 2863,33 | 1460,37 | 28,76 |
| 6 | 5,41 | 5,85 | 418,89 | 232,67 | 766,25 | 854,64 | 2855,00 | 1663,20 | 17,46 |
| 7 | 5,00 | 5,63 | 188,69 | 115,51 | 424,23 | 709,11 | 2880,00 | 1771,38 | 34,30 |
| 8 | 5,01 | 5,83 | 211,71 | 213,35 | 430,40 | 751,45 | 2680,00 | 1622,64 | 21,35 |
| 9 | 5,00 | 5,82 | 206,77 | 191,15 | 414,37 | 737,48 | 2705,00 | 1609,11 | 18,22 |
| 10 | 5,69 | 5,93 | 497,41 | 302,55 | 865,73 | 1013,72 | 2521,67 | 1886,32 | 29,77 |
| 11 | 5,70 | 6,27 | 597,71 | 570,99 | 972,62 | 996,05 | 2196,67 | 1230,50 | 25,97 |
| 12 | 5,70 | 6,03 | 531,53 | 340,37 | 948,36 | 964,39 | 2630,00 | 1669,96 | 38,70 |
| 13 | 5,41 | 6,14 | 353,94 | 443,56 | 696,37 | 974,67 | 2371,67 | 1244,02 | 30,47 |
| 14 | 5,40 | 5,93 | 378,60 | 277,89 | 652,38 | 867,79 | 2663,33 | 1784,90 | 30,53 |
| 15 | 5,40 | 5,98 | 450,54 | 313,24 | 707,88 | 885,88 | 3055,00 | 1703,77 | 32,34 |
| 16 | 5,00 | 5,88 | 122,09 | 240,07 | 348,18 | 776,53 | 2713,33 | 1561,79 | 27,46 |
| 17 | 5,00 | 5,86 | 161,55 | 235,14 | 358,87 | 774,89 | 2671,67 | 1622,64 | 22,46 |
| 18 | 5,00 | 5,81 | 295,57 | 214,17 | 509,74 | 768,31 | 2930,00 | 1724,05 | 27,68 |
| 19 | 5,68 | 5,51 | 9,87 | 0,00 | 16,85 | 64,54 | 589,33 | 385,38 | 32,78 |
| 20 | 5,39 | 5,56 | 6,99 | 10,69 | 15,21 | 51,80 | 72,67 | 392,14 | 7,30 |
| 21 | 5,06 | 5,39 | 5,34 | 0,00 | 8,22 | 62,90 | 699,33 | 513,83 | 35,12 |
| 22 | 5,73 | 5,80 | 34,94 | 52,21 | 58,37 | 104,41 | 122,67 | 493,55 | 8,63 |
| 23 | 5,39 | 5,79 | 21,79 | 50,56 | 38,64 | 106,47 | 354,33 | 446,23 | 23,41 |
| 24 | 5,00 | 5,71 | 8,63 | 45,63 | 23,84 | 99,48 | 461,00 | 473,27 | 28,66 |
| 25 | 5,39 | 5,46 | 2,47 | 0,00 | 12,74 | 60,43 | 534,33 | 398,90 | 34,65 |
| 26 | 5,40 | 5,78 | 0,00 | 50,56 | 0,00 | 106,06 | 361,00 | 385,38 | 22,62 |
| 27 | 5,68 | 5,59 | 9,45 | 24,25 | 18,09 | 68,65 | 186,83 | 459,75 | 22,46 |
| 28 | 5,71 | 5,86 | 32,89 | 70,71 | 53,03 | 120,04 | 376,00 | 486,79 | 23,16 |
| 29 | 4,99 | 5,48 | 3,29 | 13,98 | 12,33 | 38,23 | 106,00 | 500,31 | 11,10 |
| 30 | 4,99 | 5,61 | 10,69 | 28,78 | 22,61 | 69,47 | 122,67 | 466,51 | 9,17 |

Tabla A3.3.Cuantificacion del rendimiento de Hidrogeno

| Temperatura | Presion | Presion | Tiempo de muestreo | Reactor | Muestra | Composición Biogas (mL) | | | | Composicion Biogas (moles) | | | | Fracción Molar Biogas (moles/mol Total) | | | | Volumen de Gases en Headspace de 100 mL (mL)- Condicion Exerimental | | | |
|-------------|---------|---------|--------------------|---------|---------|-------------------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| (°C) | (mbar) | (atm) | hora | No. | No. | H ₂ | N ₂ | CH ₄ | CO ₂ | H ₂ | N ₂ | CH ₄ | CO ₂ | H ₂ | CH ₄ | CO ₂ | N ₂ | H ₂ | CH ₄ | CO ₂ | N ₂ |
| 32,3 | 387 | 0,375 | 42 | 2 | 1 | 0,085 | 0,969 | 0,002 | 0,478 | 0,0013 | 0,0145 | 0,000030 | 0,0071 | 0,0554 | 0,0013 | 0,3116 | 0,6317 | 13,85 | 0,33 | 77,90 | 157,92 |
| 34,5 | 566 | 0,547 | 93 | | 2 | 0,018 | 0,952 | 0,065 | 0,575 | 0,0004 | 0,0206 | 0,0014 | 0,0125 | 0,0112 | 0,0404 | 0,3571 | 0,5913 | 2,80 | 10,09 | 89,29 | 147,83 |
| 33,3 | 537 | 0,519 | 142 | | 3 | 0 | 0,529 | 0,033 | 0,237 | 0,0000 | 0,0109 | 0,0007 | 0,0049 | 0,0000 | 0,0413 | 0,2966 | 0,6621 | 0,00 | 10,33 | 74,16 | 165,52 |
| 34,2 | 608 | 0,588 | 214 | | 4 | 0 | 0,703 | 0,061 | 0,497 | 0,0000 | 0,0164 | 0,0014 | 0,0116 | 0,0000 | 0,0484 | 0,3941 | 0,5575 | 0,00 | 12,09 | 98,53 | 139,37 |
| 32,3 | 710 | 0,686 | 42 | 5 | 1 | 0,2 | 1,042 | 0 | 0,543 | 0,0055 | 0,0285 | 0,0000 | 0,0149 | 0,1120 | 0,0000 | 0,3042 | 0,5838 | 28,01 | 0,00 | 76,05 | 145,94 |
| 34,5 | 1016 | 0,982 | 93 | | 2 | 0,187 | 0,838 | 0,022 | 0,565 | 0,0073 | 0,0326 | 0,0009 | 0,0220 | 0,1160 | 0,0136 | 0,3505 | 0,5199 | 29,00 | 3,41 | 87,62 | 129,96 |
| 33,3 | 729 | 0,705 | 142 | | 3 | 0,017 | 0,342 | 0,029 | 0,227 | 0,0005 | 0,0096 | 0,0008 | 0,0064 | 0,0276 | 0,0472 | 0,3691 | 0,5561 | 6,91 | 11,79 | 92,28 | 139,02 |
| 34,2 | 733 | 0,709 | 214 | | 4 | 0,003 | 0,704 | 0,069 | 0,511 | 0,0001 | 0,0198 | 0,0019 | 0,0144 | 0,0023 | 0,0536 | 0,3970 | 0,5470 | 0,58 | 13,40 | 99,26 | 136,75 |
| 32,3 | 430 | 0,416 | 42 | 9 | 1 | 0,125 | 0,971 | 0 | 0,436 | 0,0021 | 0,0161 | 0,0000 | 0,0072 | 0,0816 | 0,0000 | 0,2846 | 0,6338 | 20,40 | 0,00 | 71,15 | 158,45 |
| 34,5 | 906 | 0,876 | 93 | | 2 | 0,169 | 0,788 | 0,015 | 0,485 | 0,0059 | 0,0273 | 0,0005 | 0,0168 | 0,1160 | 0,0103 | 0,3329 | 0,5408 | 29,00 | 2,57 | 83,22 | 135,21 |
| 33,3 | 622 | 0,601 | 142 | | 3 | 0,009 | 0,645 | 0,032 | 0,363 | 0,0002 | 0,0154 | 0,0008 | 0,0087 | 0,0086 | 0,0305 | 0,3460 | 0,6149 | 2,14 | 7,63 | 86,51 | 153,72 |
| 34,2 | 661 | 0,639 | 214 | | 4 | 0 | 0,776 | 0,048 | 0,557 | 0,0000 | 0,0197 | 0,0012 | 0,0141 | 0,0000 | 0,0348 | 0,4033 | 0,5619 | 0,00 | 8,69 | 100,83 | 140,48 |
| 32,3 | 637 | 0,616 | 42 | 12 | 1 | 0,134 | 0,846 | 0,002 | 0,43 | 0,0033 | 0,0208 | 0,0000 | 0,0106 | 0,0949 | 0,0014 | 0,3045 | 0,5992 | 23,73 | 0,35 | 76,13 | 149,79 |
| 34,5 | 686 | 0,663 | 93 | | 2 | 0,062 | 0,924 | 0,051 | 0,566 | 0,0016 | 0,0243 | 0,0013 | 0,0149 | 0,0387 | 0,0318 | 0,3531 | 0,5764 | 9,67 | 7,95 | 88,27 | 144,10 |
| 33,3 | 645 | 0,623 | 142 | | 3 | 0,006 | 0,862 | 0,057 | 0,363 | 0,0001 | 0,0214 | 0,0014 | 0,0090 | 0,0047 | 0,0443 | 0,2818 | 0,6693 | 1,16 | 11,06 | 70,46 | 167,31 |
| 34,2 | 744 | 0,719 | 214 | | 4 | 0 | 0,678 | 0,195 | 0,496 | 0,0000 | 0,0193 | 0,0056 | 0,0141 | 0,0000 | 0,1424 | 0,3623 | 0,4953 | 0,00 | 35,61 | 90,58 | 123,81 |
| 32,3 | 185 | 0,179 | 42 | 15 | 1 | 0,001 | 1,115 | 0,001 | 0,427 | 0,0000 | 0,0080 | 0,0000 | 0,0030 | 0,0006 | 0,0006 | 0,2766 | 0,7222 | 0,16 | 0,16 | 69,14 | 180,54 |
| 34,5 | 798 | 0,772 | 93 | | 2 | 0,168 | 0,949 | 0,027 | 0,587 | 0,0051 | 0,0290 | 0,0008 | 0,0179 | 0,0971 | 0,0156 | 0,3391 | 0,5482 | 24,26 | 3,90 | 84,78 | 137,06 |
| 33,3 | 649 | 0,628 | 142 | | 3 | 0,013 | 0,771 | 0,058 | 0,366 | 0,0003 | 0,0193 | 0,0014 | 0,0091 | 0,0108 | 0,0480 | 0,3030 | 0,6382 | 2,69 | 12,00 | 75,75 | 159,56 |
| 34,2 | 728 | 0,704 | 214 | | 4 | 0 | 0,772 | 0,104 | 0,574 | 0,0000 | 0,0216 | 0,0029 | 0,0160 | 0,0000 | 0,0717 | 0,3959 | 0,5324 | 0,00 | 17,93 | 98,97 | 133,10 |
| 33,9 | 285 | 0,275 | 47 | 18 | 1 | 0,037 | 0,934 | 0 | 0,358 | 0,0004 | 0,0102 | 0,0000 | 0,0039 | 0,0278 | 0,0000 | 0,2694 | 0,7028 | 6,96 | 0,00 | 67,34 | 175,70 |
| 34,5 | 1010 | 0,977 | 93 | | 2 | 0,224 | 0,888 | 0,018 | 0,563 | 0,0087 | 0,0344 | 0,0007 | 0,0218 | 0,1323 | 0,0106 | 0,3325 | 0,5245 | 33,08 | 2,66 | 83,14 | 131,13 |
| 33,3 | 641 | 0,620 | 142 | | 3 | 0,003 | 0,636 | 0,039 | 0,354 | 0,0001 | 0,0157 | 0,0010 | 0,0087 | 0,0029 | 0,0378 | 0,3430 | 0,6163 | 0,73 | 9,45 | 85,76 | 154,07 |
| 34,2 | 710 | 0,687 | 214 | | 4 | 0,002 | 0,718 | 0,063 | 0,506 | 0,0001 | 0,0196 | 0,0017 | 0,0138 | 0,0016 | 0,0489 | 0,3926 | 0,5570 | 0,39 | 12,22 | 98,14 | 139,26 |

Tabla A3. 4. Cuantificación del rendimiento de Hidrogeno (Continuación)

| Volumen de Gases en Headspace de 100 mL (mL)- Condicion Normal | | | | Moles CN | Carbohidratos reducidos (mg.L ⁻¹ Glucosa) | Carbohidratos reducidos (g Glucosa) | Carbohidratos reducidos (g DQO _{Total}) | Rendimiento (mL.g Glucosa ⁻¹) | Rendimiento (mL.g DQO ⁻¹) | Rendimiento (mol.mol Glucosa ⁻¹) |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| H ₂ | CH ₄ | CO ₂ | N ₂ | H ₂ | H ₂ | H ₂ | H ₂ | H ₂ | H ₂ | H ₂ |
| 4,64 | 0,11 | 26,10 | 52,90 | 0,000207056 | 470,00 | 0,19 | 1,02 | 24,68 | 4,54 | 0,198 |
| 1,36 | 4,90 | 43,38 | 71,82 | 0,000060590 | | | | | | |
| 0,00 | 4,78 | 34,33 | 76,63 | 0,000000000 | | | | | | |
| 0,00 | 6,32 | 51,53 | 72,89 | 0,000000000 | | | | | | |
| 17,20 | 0,00 | 46,69 | 89,59 | 0,000767278 | 462,00 | 0,18 | 1,00 | 136,90 | 25,17 | 1,100 |
| 25,30 | 2,98 | 76,44 | 113,37 | 0,001128789 | | | | | | |
| 4,35 | 7,41 | 58,03 | 87,42 | 0,000193892 | | | | | | |
| 0,37 | 8,45 | 62,58 | 86,22 | 0,000016393 | | | | | | |
| 7,58 | 0,00 | 26,45 | 58,90 | 0,000338320 | 473,00 | 0,19 | 1,03 | 119,19 | 21,92 | 0,958 |
| 22,55 | 2,00 | 64,72 | 105,15 | 0,001006190 | | | | | | |
| 1,15 | 4,09 | 46,38 | 82,40 | 0,000051304 | | | | | | |
| 0,00 | 4,94 | 57,27 | 79,79 | 0,000000000 | | | | | | |
| 13,08 | 0,20 | 41,96 | 82,56 | 0,000583497 | 452,00 | 0,18 | 0,98 | 72,33 | 13,30 | 0,581 |
| 5,70 | 4,68 | 51,99 | 84,88 | 0,000254119 | | | | | | |
| 0,65 | 6,15 | 39,15 | 92,97 | 0,000028873 | | | | | | |
| 0,00 | 22,76 | 57,89 | 79,13 | 0,000000000 | | | | | | |
| 0,03 | 0,03 | 11,05 | 28,86 | 0,000001155 | 459,00 | 0,18 | 1,00 | 90,569 | 16,66 | 0,728 |
| 16,63 | 2,67 | 58,10 | 93,93 | 0,000741948 | | | | | | |
| 1,51 | 6,72 | 42,40 | 89,32 | 0,000067200 | | | | | | |
| 0,00 | 11,22 | 61,95 | 83,32 | 0,000000000 | | | | | | |
| 1,70 | 0,00 | 16,49 | 43,03 | 0,000076060 | 463,00 | 0,19 | 1,01 | 154,89 | 28,48 | 1,245 |
| 28,69 | 2,31 | 72,10 | 113,72 | 0,001279928 | | | | | | |
| 0,40 | 5,22 | 47,39 | 85,14 | 0,000017920 | | | | | | |
| 0,24 | 7,46 | 59,90 | 84,99 | 0,000010563 | | | | | | |